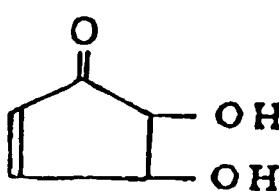




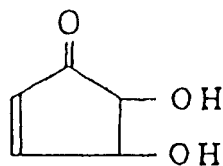
PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 A61K 31/12, A23L 1/30, 2/52</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO98/43623</p> <p>(43) 国際公開日 1998年10月8日(08.10.98)</p>										
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/01149</p> <p>(22) 国際出願日 1998年3月18日(18.03.98)</p> <p>(30) 優先権データ</p> <table border="0"> <tr> <td>特願平9/96399</td> <td>1997年4月1日(01.04.97)</td> </tr> <tr> <td>特願平9/163473</td> <td>1997年6月6日(06.06.97)</td> </tr> <tr> <td>特願平9/241680</td> <td>1997年8月25日(25.08.97)</td> </tr> <tr> <td>特願平9/283204</td> <td>1997年10月1日(01.10.97)</td> </tr> <tr> <td>特願平9/362273</td> <td>1997年12月12日(12.12.97)</td> </tr> </table> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 資酒造株式会社(TAKARA SHUZO CO., LTD.)(JP/JP) 〒612-8061 京都府京都市伏見区竹中町609番地 Kyoto, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ)</p> <p>小山信人(KOYAMA, Nobuto)(JP/JP)</p> <p>務 華康(WU, Hua-Kang)(CA/JP)</p> <p>富永隆生(TOMINAGA, Takanari)(JP/JP)</p> <p>西山英治(NISHIYAMA, Eiji)(JP/JP)</p> <p>萩屋道雄(HAGIYA, Michio)(JP/JP)</p> <p>榎 竜嗣(ENOKI, Tatsuji)(JP/JP)</p> <p>大野木宏(OHNOGI, Hiromu)(JP/JP)</p> <p>加藤郁之進(KATO, Ikunoshin)(JP/JP)</p> <p>〒520-2193 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号</p> <p>資酒造株式会社 中央研究所内 Shiga, (JP)</p>		特願平9/96399	1997年4月1日(01.04.97)	特願平9/163473	1997年6月6日(06.06.97)	特願平9/241680	1997年8月25日(25.08.97)	特願平9/283204	1997年10月1日(01.10.97)	特願平9/362273	1997年12月12日(12.12.97)	<p>(74) 代理人 弁理士 安達光雄, 外(ADATI, Mituo et al.) 〒550-0001 大阪府大阪市西区土佐堀1丁目6番20号 新栄ビル6階 Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GI, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
特願平9/96399	1997年4月1日(01.04.97)											
特願平9/163473	1997年6月6日(06.06.97)											
特願平9/241680	1997年8月25日(25.08.97)											
特願平9/283204	1997年10月1日(01.10.97)											
特願平9/362273	1997年12月12日(12.12.97)											
<p>(54)Title: ANTIRHEUMATIC AGENTS</p> <p>(54)発明の名称 抗リウマチ剤</p> <p>(57) Abstract</p> <p>Antirheumatic agents characterized by containing as the active ingredient at least one compound selected from among 4,5-dihydroxy-2-cyclopenten-1-one of the formula (I), optical isomers thereof, and salts of them.</p> <div style="text-align: center;">  <p>(I)</p> </div>												

## (57)要約

下記式【I】で表される4, 5-ジヒドロキシー-2-シクロペンテン-1-オン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物を有効成分として含有することを特徴とする抗リウマチ剤。



【I】

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AM	アルメニア	FR	フランス	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AT	オーストリア	GA	ガボン	LT	リトアニア	SN	セネガル
AU	オーストラリア	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	TD	チャド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	ジョージア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BE	ベルギー	GM	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GN	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TR	トルコ
BF	ブルkina・ファソ	GW	ギニア・ビサウ			TT	トリニダード・トバゴ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	ML	マリ	UA	ウクライナ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	US	米国
CA	カナダ	ID	インドネシア	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MX	メキシコ	VN	ベトナム
CG	コンゴ	IL	イスラエル	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラヴィア
CH	スイス	IS	アイスランド	NL	オランダ	YW	ジンバブエ
CI	コート・ボワール	IT	イタリア	NO	ノルウェー		
CM	カメルーン	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CN	中国	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CU	キューバ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CY	キプロス	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
CZ	チェコ	KR	韓国	RU	ロシア		
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
DK	デンマーク	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		
EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール		
ES	スペイン	LK	スリランカ	SI	スロベニア		

## 明 細 書

## 抗リウマチ剤

## 発明の属する技術分野

本発明は慢性関節リウマチ等の炎症性疾患の治療・予防に有用な医薬、食品及び飲料に関する。

## 従来技術

炎症は生体が外からの侵襲に対して防御的に働いて、内因性の活性物質を産生し、体の状態を適応させている結果と考えられている。しかしそれらによって起こされる反応が害になり、病的な状態を引起することが多い。また、自己免疫疾患における炎症は免疫細胞が自己を異物と見なし、正常細胞に対しても障害的に働くことにより生じる。

ヘルパーT (Th) 細胞にはマクロファージ (Mφ) などの細胞性免疫の活性化を促すサイトカインであるインターフェロン-γ (IFN-γ)、インターロイキン-2を産生するTh1細胞と抗体産生に関与した液性免疫を活性化するインターロイキン-4、インターロイキン-5、インターロイキン-10を産生するTh2細胞が存在することが報告されている。

またTh1細胞とTh2細胞はそれぞれ産生するサイトカインによって互いに制御し合っていることも示されている。すなわちTh1細胞の産生するIFN-γはTh2細胞の活性化を制御しTh1細胞の活性化を誘導する。逆にTh2細胞の産生するインターロイキン-10はTh1細胞の活性化を制御し、インターロイキン-4はTh2細胞の活性化を誘導する。

自己免疫疾患は大別して臓器特異性のものと全身性のものとに分類されている。全身性自己免疫疾患やアレルギー疾患はTh2 優位の免疫応答により病態が形成されるのに対して、臓器特異自己免疫疾患や炎症性疾患はTh1 優位の免疫応答で病態が形成されると考えられる。

従って、臓器特異性、全身性、アレルギー性自己免疫疾患の病態形成の可能性が示唆されている。実際、リウマチ患者の炎症部位においてはTh1由来のサイトカインにより誘導

、活性化されたと考えられるMφ及び好中球の浸潤、並びにMφから産生される腫瘍壊死因子-αの著明な増加が認められている。またその他の臓器特異自己免疫疾患や炎症性疾患においても同様の組織所見が観察されており、Th1により誘導されたこれら炎症細胞および炎症性サイトカインにより炎症が増悪化していると考えられる。

これらのことより、慢性関節リウマチなどの臓器特異自己免疫疾患や炎症性疾患の治療においては炎症を直接惹起していると考えられる、Mφから産生される腫瘍壊死因子の抑制、およびTh1 抑制サイトカインであるインターロイキン-10の誘導が重要であると考えられる〔医学の歩み、医歯薬出版（株）発刊、第182巻、第523～528頁、同、第661～665頁（1997）〕。

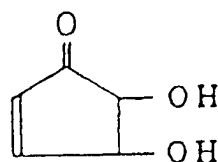
慢性関節リウマチの薬物治療法としては、ステロイド、非ステロイド系抗炎症剤と、金、D-ペニシラミン等の寛解導入薬による内科的治療が行われている。発明が解決しようとする課題

本発明の目的は、慢性関節リウマチ等の炎症性疾患の治療に有用な化合物を開発し、該化合物を含有する医薬、食品および飲料を提供することにある。

課題を解決するための手段

本発明者らは上記目的を達成するために鋭意検討した結果、式【I】で表される4, 5-ジヒドロキシー-2-シクロペンテン-1-オン（以下、単にシクロペントノンと称す）がリウマチ等の炎症性疾患や免疫異常を伴う疾患等の治療又は予防に有用であることを見出し、本発明を完成させた。

本発明を概説すれば、本発明の第1の発明は下記式【I】で表される4, 5-ジヒドロキシー-2-シクロペンテン-1-オン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物を有効成分として含有することを特徴とする抗リウマチ剤に関する。



【I】

本発明の第2の発明は上記式【1】で表される4, 5-ジヒドロキシー-2-シクロペンテン-1-オン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物を含有することを特徴とするリウマチ改善用食品又は飲料、又はリウマチ予防用食品又は飲料に関する。

#### 図面の簡単な説明

図1は J u r k a t細胞の増殖に対するシクロペンテノンの影響を示す図である。

図2はM o l t-3細胞の増殖に対するシクロペンテノンの影響を示す図である。

図3はM o l t-3細胞におけるファス抗原の発現を示す図である。

図4はJ u r k a t細胞におけるファス抗原の発現を示す図である。

図5はM o l t-3細胞に10  $\mu$ Mシクロペンテノンを添加して培養したときのファス抗原発現細胞の比率の変化を示す図である。

図6はシクロペンテノン量と足浮腫増加率の関係を示す図である。

図7はシクロペンテノン量と腫瘍壊死因子産生量の関係を示す図である。

図8は培養液中のシクロペンテノン濃度とNO<sub>2</sub><sup>-</sup>濃度の関係を示す図である。

図9はシクロペンテノン存在下の培養時間と生細胞数の関係を示す図である。

図10はシクロペンテノンの遅延型過敏反応抑制作用を示す図である。

図11はシクロペンテノンのリンパ球幼若化抑制作用を示す図である。

図12はシクロペンテノンの混合リンパ球反応抑制作用を示す図である。

図13は(-)体シクロペンテノンのp-ジメチルアミノベンゾイル誘導体のCD及び(-)体シクロペンテノンの立体構造を示す図である。

図14は(+)体シクロペンテノンのp-ジメチルアミノベンゾイル誘導体のCD及び(+)体シクロペンテノンの立体構造を示す図である。

#### 発明の実施の形態

本発明の第1の発明は上記式【1】で表される4, 5-ジヒドロキシー-2-シクロペンテン-1-オン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物を含有することを特徴とするリウマチ改善用食品又は飲料、又はリウマチ予防用食品又は飲料に関する。

る。本発明においてはシス体シクロペンテノンを用いてもよいし、トランス体シクロペンテノンを用いてもよいし、シス体シクロペンテノンとトランス体シクロペンテノンの混合物を用いてもよい。また、これらの光学活性体を用いてもよい。

シス体シクロペンテノンは化学合成法によって得られる〔ヘルベチカ キミカ アクタ (H e l v e t i c a C h i m i c a A c t a)、第55巻、第2838～2844頁(1972)〕。トランス体シクロペンテノンは化学合成法によっても得られるし〔カーボハイドレート リサーチ (C a r b o h y d r a t e R e s . )、第247巻、第217～222頁(1993)〕、またウロン酸、例えばグルクロン酸、ウロン酸誘導体、例えばグルクロノラクトン、又はこれらの含有物等を加熱処理することによっても得られる(PCT/J P 97/03052号明細書参照)。本発明ではシクロペンテノンを含むこれらの加熱処理物、その部分精製物及び精製物も使用できる。

例えば、ウロン酸としてD-グルクロン酸を使用し、その1%溶液を121℃で4時間加熱処理することにより、加熱処理物中にシクロペンテノンが生成される。この加熱処理物中のシクロペンテノンを溶媒で抽出し、抽出物を濃縮する。次にこの濃縮物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離し、溶出するシクロペンテノン画分を濃縮し、濃縮物からシクロペンテノンをクロロホルムで抽出し、抽出濃縮物の順相カラムクロマトグラフィーを行うことにより、加熱処理物中のシクロペンテノンが単離される。

シクロペンテノンの物性を下記に示す。なおシクロペンテノンの質量分析はDX302質量分析計(日本電子社製)を用いて行った。また、重クロロホルム溶媒を用いたNMRスペクトルの測定はJNM-A500(日本電子社製)を用いた。比旋光度はDIP-370型旋光計(日本分光社製)、UV吸収スペクトルはUV-2500分光光度計(島津製作所社製)、赤外吸収スペクトル(IR)はFTIR-8000赤外分光光度計(島津製作所社製)をそれぞれ用い測定した。

MS  $m/z$  115  $[M+H]^+$

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )

$\delta$  4.20 (1H, d,  $J=2.4\text{ Hz}$ , 5-H)、4.83 (1H, m, 4-H)、6.30 (1H, dd,  $J=1.2, 6.1\text{ Hz}$ , 2-H)、7.48 (1H, dd,  $J=2.1, 6.1\text{ Hz}$ , 3-H)

但し、 $^1\text{H-NMR}$ の化学シフト値は $\text{CHCl}_3$ の化学シフト値を7.26 ppmとして表した。

旋光度:  $[\alpha]_D^{20} = 0^\circ$  ( $c = 1.3$ , 水)

UV:  $\lambda_{\text{max}} = 215\text{ nm}$  (水)

IR (KBr法): 3400、1715、1630、1115、1060、1025  $\text{cm}^{-1}$ に吸収を有する。

単離されたシクロペンテノンを経光学分割することにより、(−)-4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン及び(+)-4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンを得ることができる。当然、合成方法により得られたシクロペンテノンも光学分割することができる。

例えば、シクロペンテノンをエタノールに溶かす。このエタノール溶液にヘキサノール/エタノール(94/6)を更に加え、シクロペンテノン溶液を調製する。この試料溶液を、例えばキラルパック AS (ダイセル化学工業) カラムを用いカラム温度: 40°C、移動相: ヘキサノール/エタノール(94/6)でHPLCを行うことにより、シクロペンテノンを光学分割することができる。

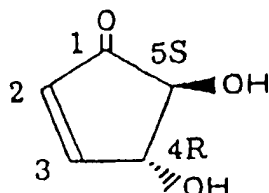
分割された(−)-トランス-4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン〔以下、(−)体シクロペンテノンと称する〕の旋光度は $[\alpha]_D^{20} = -10.5^\circ$  ( $c = 0.30$ , エタノール)であり、(+)-トランス-4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン〔以下、(+)-体シクロペンテノンと称する〕の旋光度は $[\alpha]_D^{20} = +10.4^\circ$  ( $c = 0.53$ , エタノール)である。なお旋光度は前記のDIP-200型旋光計(日本分光社製)を用いて測定した。

紫外吸収スペクトルの測定を上記記載の方法に進む。その結果、両光学活性

体は光学分割前のシクロペンテノンと同一の結果を示す。

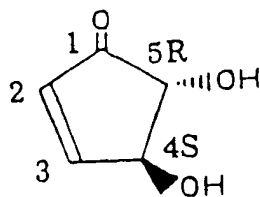
光学分割された（－）体シクロペンテノン及び（＋）体シクロペンテノンをそれぞれ *p*－ジメチルアミノベンゾイル誘導体とし、J－720型円二色性分散計（日本分光社製）を用い、円二色性スペクトル（CD）を測定し、その結果をジベンゾエートキラリティールに適用し〔ジャーナル オブ アメリカン ケミカル ソサイエティ（J. Am. Chem. Soc. ）、第91巻、第3989～3991頁（1969）〕、その立体配置を決定した。

（－）体シクロペンテノンの *p*－ジメチルアミノベンゾイル誘導体のCD及び（－）体シクロペンテノンの立体構造を図13に示す。図中縦軸はモル円二色性、横軸は波長（nm）を示す。なお、上記立体構造を、式【II】として下記に示す：



【II】

（＋）体シクロペンテノンの *p*－ジメチルアミノベンゾイル誘導体のCD及び（＋）体シクロペンテノンの立体構造を図14に示す。図中縦軸はモル円二色性、横軸は波長（nm）を示す。なお、上記立体構造を、式【III】として下記に示す：



【III】



図13、14及び式【II】、式【III】に示すように（－）体シクロペンテノン  
 は（－）－（4R，5S）－トランス－4，5－ジヒドロキシ－2－シクロペ  
 ンテン－1－オン、（＋）体シクロペンテノンは（＋）－（4S，5R）－ト  
 ランス－4，5－ジヒドロキシ－2－シクロペンテン－1－オンである。

以上、本発明に使用するシクロペンテノン又はその光学活性体はいかなる方法  
 で製造しても良く、明細書で開示の方法で製造しても良く、化学合成方法で合成  
 しても良く、シクロペンテノンのトランス体、シス体、それらの混合物およびそ  
 れらの光学活性体も本発明に使用される。

シクロペンテノン又はその光学活性体の塩としては、医薬として許容される塩  
 があり、公知の方法にて変換することができる。

シクロペンテノンは生体内で、例えばSH基含有化合物（例えばシステイン、  
 グルタチオン等）と反応し、医薬として有用な代謝誘導体を生成する。したがっ  
 て、この代謝誘導体を示す薬効はシクロペンテノンを投与した場合においても得  
 られると考えられる。生体内でのシクロペンテノンとSH基含有化合物との反応  
 生成物は代謝有効物質の一つと推定される。

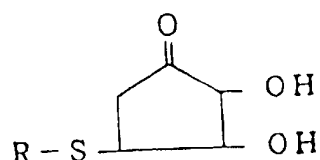
すなわちSH基含有化合物（R－SH）について例示すれば、シクロペンテノ  
 ンはSH基含有化合物と反応し、例えば下記一般式【IV】又は下記一般式【V】  
 で表される化合物となる。また一般式【V】で表される化合物は一般式【IV】で  
 表される化合物に変換される。

このようにシクロペンテノンはSH基含有化合物（R－SH）の存在下、各代  
 謝誘導体に変換され、生体中において生成されるこれらの代謝誘導体も医薬とし  
 ての効果を発揮する。

$$\begin{array}{c} \text{OH} \\ | \\ \text{---} \end{array}$$

【III】

（但し、RはSH基含有化合物からSH基を除いた残基である）



【V】

(但し、RはSH基含有化合物からSH基を除いた残基である)。

したがってこれら生体内で形成される反応生成物、すなわち生体内での代謝誘導体の形成を目的とするシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩の使用も本発明に包含されるものである。

シクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩は抗リウマチ作用、慢性関節リウマチ抑制作用等の生理活性を有する化合物であり、シクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物を有効成分とし、これを公知の医薬用担体と組合せ製剤化すれば抗リウマチ剤を製造することができる。該医薬の製造は一般的には、シクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物を薬学的に許容できる液状又は固体状の担体と配合し、かつ必要に応じて溶剤、分散剤、乳化剤、緩衝剤、安定剤、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤等を加えて、錠剤、顆粒剤、散剤、粉末剤、カプセル剤等の固形剤、通常液剤、懸濁剤、乳剤等の液剤とすることができる。またこれを使用前に適当な担体の添加によって液状となし得る乾燥品とすることができる。

医薬用担体は、上記投与形態及び剤型に応じて選択することができ、経口剤の場合は、例えばデンプン、乳糖、白糖、マンニット、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩等が利用される。また経口剤の調製に当っては、更に結合剤、崩壊剤、界面活性剤、潤沢剤、流動性促進剤、矯味剤、着色剤、香料等を配合することもできる。

一方、非経口剤の場合は、常法に従い本発明の有効成分であるシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化



上記抗リウマチ剤に準じた方法で投与することができる。

これら製剤の投与量は、上記抗リウマチ剤に準じて適宜設定することができる。例えば抗炎症剤、腫瘍壊死因子産生抑制剤としては製剤中に含有されるシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される1以上の化合物の量は好適には成人1日当り10 $\mu$ g $\sim$ 50mg/kgであり、一酸化窒素産生抑制剤としては製剤中に含有されるシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される1以上の化合物の量は好適には成人1日当り0.1 $\mu$ g $\sim$ 20mg/kgであり、使用目的により製剤中の有効成分量を調節することができる。これらの薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

リウマチは骨膜細胞や軟骨細胞に障害が起こる自己免疫疾患であり、本発明の抗リウマチ剤は自己免疫疾患治療剤としても有用である。

シクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩は慢性関節リウマチなどの臓器特異自己免疫疾患や炎症性疾患において、炎症を直接惹起していると考えられる腫瘍壊死因子の産生を抑制し、Th1抑制サイトカインであるインターロイキン-10の産生を増強する。したがって炎症、例えば臓器特異自己免疫疾患であるリウマチ、特に慢性関節リウマチの症状が改善され、炎症マーカーであるC反応タンパク(CRP)値、リウマトイド因子(rheumatoid factor: RF)値、赤血球沈降速度(血沈)値が激減し、歩行困難等の合併症状も顕著に改善される。

腫瘍壊死因子は、腫瘍部位に出血性壊死を誘導する因子として発見されたが、現在では炎症を基本とした生体防御・免疫機構に広くかかわるサイトカインとして認識されている。この腫瘍壊死因子の産生調節機構の破綻は様々な不都合を宿主にもたらし、腫瘍壊死因子の過度又は未調節の産生は、慢性関節性リウマチ、リウマチ性脊髄炎、変形性関節症、痛風性関節炎、敗血症、敗血性ショック、内毒素ショック、グラム陰性菌敗血症、毒性ショック症候群、脳性マラリア、慢性肺炎、移植片対宿主反応、同種移植片拒絶反応、インフルエンザのような感染症による発熱及び筋肉痛、感染又は悪性腫瘍に対して二次的な悪液質、ヒト後天性

免疫不全症候群（AIDS）に対して二次的な悪液質、AIDS、AIDS関連症候群、ケロイド形成、潰瘍性大腸炎、多発性硬化症、自己免疫糖尿病及び全身エリテマトーデス等の自己免疫疾患を含む、これらの多くの疾患に関連している [モレキュラー メディシン (Molecular Medicine)、第33巻、第1010～1020頁、第1182～1189頁 (1996)]。本発明の抗リウマチ剤は、腫瘍壊死因子により媒介されるか又は悪化する病状の治療にも有用である。また本発明により、シクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物を有効成分として使用する腫瘍壊死因子の産生の調節方法が提供される。また本発明により、シクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物を含有し、腫瘍壊死因子により媒介されるか又は悪化する疾病の病状の改善用食品又は飲料、又は疾病予防用食品又は飲料が提供される。

一酸化窒素（以下、NOと略す）は内皮細胞由来血管平滑筋弛緩因子（EDRF）の本体である [ネイチャー (Nature)、第327巻、第524～526頁 (1987)]。本発明はシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物を有効成分として含有するNO産生の抑制を必要とする疾病治療用医薬又は疾病予防用医薬を提供する。本発明において、NO産生の抑制を必要とする疾病とは、特に限定はないが、例えば毒性ショックやある種のサイトカインによる治療等による全身性血圧低下、血圧応答低下、自己免疫疾患、炎症、関節炎、リウマチ性関節炎、糖尿病、炎症性腸疾患、血管機能不全、病因性血管拡張、組織損傷、心臓血管系虚血、痛感過敏症、脳虚血、血管新生を伴う疾病、がん等があり、特表平9-504524号、特表平9-505288号、特表平8-501069号、特表平8-512318号、特表平6-508849号の各公報に記載の疾病を含むものである。

本発明の化合物は、NO産生を抑制する作用を有する物質から選択される少くとも1以上の化合物を含有する医薬組成物として、NO産生機構に関する研究、NO作用機構研究にも有用であり、またNO産生機構に関与する物質のスクリーニングに使用することもできる。

シクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩はNO産生細胞に対してNO産生抑制作用を示す。例えば、マクロファージ細胞株にエンドトキシン(LPS)を添加すれば誘導型NO合成酵素(NOS)が発現してNOが培地中に分泌されるが、シクロペンテノン、シクロペンテノン誘導体、又はそれらの光学活性体共存下でLPSを作用させるとNO産生は抑えられる。LPS処理でNO産生を誘導した場合、NOの細胞障害活性によって細胞生存率は低下するが、LPS処理時にシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩を添加するとNOの産生が低下し、細胞に対する障害も減少する。

固形がんの増大に血管新生は必須であるが、欠陥内皮増殖因子／血管透過性亢進因子(VEGF)はこの過程に重要な役割を演じている。様々ながん細胞においてVEGFがNOによって誘導される。シクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩はNO産生を抑制することによってがん細胞のVEGF産生も抑制し、その結果、がん組織周辺での血管新生が阻害される。がん細胞を皮下に移植して固形腫瘍を形成させたマウスにシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩を投与するとがん組織の周辺の血管の形成が不十分となり、がんは脱落する。

ニトロソアミンは2級アミンにニトロソ基が付加した一群の化合物で数百種類が知られており、その多くがDNAに損傷を加えることにより動物に対して発がん性を示す。ニトロソアミンはヒトの発がんにも深く関わっているとされており、通常胃の中で亜硝酸塩とアミンが反応することによって生成する。NOはpH中性の生理的条件下でもアミンと反応してニトロソアミンを生成する。また、疫学的にがんとの関係が高い肝吸虫感染患者や肝硬変患者においてNO産生は亢進している。したがって、シクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩を投与してNO産生の亢進を防ぐことによって特にハイリスクグループの発がんを予防することができる。以上のように、シクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩は発がんの抑制とがん組織における血管新生阻害という2段階で制がん作用を示す。

NOはまた、炎症性病変に特徴的に認められる浮腫、すなわち血管透過性亢進

作用を誘発し〔マエダ (Maeda) ら、ジャパニーズ ジャーナル オブ カンサー リサーチ (Japanese Journal of Cancer Research)、第85巻、第331～334頁 (1994)〕、また、炎症性メディエーターであるプロスタグランジン類の生合成を亢進させる〔サルベミニ (Salvemini) ら、プロシーディングズ オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンシズ USA (Proceedings of National Academy of Sciences, USA)、第90巻、第7240～7244頁 (1993)〕。一方、NOはスーパーオキシドラジカルと速やかに反応してパーオキシナイトライトを生じ、パーオキシナイトライトが炎症性の細胞、組織障害を引き起こすとも考えられている。

活性化された免疫細胞が臓器に入り込みサイトカインを放出するとNOの産生が誘導される。インスリン依存型糖尿病は膵島β細胞が特異的に破壊されることによって引き起こされる疾患であり、NOによる破壊であるとされている。また、慢性関節性リウマチ、変形性関節リウマチ、痛風性関節炎、ベーチェット病に伴う関節炎の患者の病変部の関節液には同患者の正常な関節や健常人の関節の関節液に比べて高濃度のNOが含まれている。これらの患者にシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩を投与すると病変部におけるNO産生を抑制し、症状が改善する。

脳虚血中及び再灌流後にはNO産生が増大し、それに伴って脳組織が損傷を受ける。脳虚血時に患者にシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩を投与することにより脳組織の損傷が軽減され、予後が改善される。

ファス抗原 (APO-1 抗原、CD95) と呼ばれる細胞表面抗原はアポトーシスを誘導する分子として注目されている〔セル (Cell)、第66巻、第233～243頁 (1991)、ジャーナル オブ エクスペリメンタル メディ

cine、第267巻、第10709～10715頁 (1992)、ジャーナル オブ イムノロジー (J. Immunology)、第184巻、第1274～

1281頁 (1990)、ジャーナル オブ クリニカル イノベーション (J. Clin. Invest.)、第94巻、第1070～1075頁 (1994)〕。

シクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩は、免疫系に作用する。シクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩は、免疫系に作用する。

1279頁(1992)】。

ファス抗原は、胸腺細胞、T細胞、細胞傷害性T細胞、B細胞あるいはNK細胞等の免疫系細胞に発現している。免疫系は外来の非自己抗原の侵入に際しては、免疫反応を惹起して非自己抗原を排除する。しかしながら、自己抗原に対しては免疫反応を示さず自己寛容が成立している。これは自己反応性を有するリンパ球系幹細胞が、クローン除去というネガティブセレクションを受けアポトーシスによる細胞死により排除されることによる。しかしながらファス抗原の遺伝子的欠陥等の生体の何らかの異常によりこれらの細胞がアポトーシスを受けなかった場合には、例えば自己反応性T細胞が末梢に蓄積される。また正常な生体においては、免疫担当細胞であるB細胞についても自己寛容が成立しており、この自己反応性B細胞も通常、アポトーシスにより死に至るが、自己反応性B細胞がファス抗原の遺伝的な欠陥等の異常によりアポトーシスを受けなかった場合には、自己反応性B細胞が末梢に蓄積される。更に、関節リウマチの場合には、上記の自己反応性リンパ球の異常、滑膜細胞のターンオーバーの異常が病因の一端となっている。

シクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物を有効成分とするファス抗原産生誘導剤は自己反応性リンパ球、ターンオーバーの異常により生体から排除され得なかった不用の生体構成細胞のアポトーシス誘導に有用であり、ファス抗原産生誘導方法に使用することができる。またシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物を有効成分として含有するファス抗原産生異常を伴う疾病の予防剤又は治療剤として有用である。本発明においてファス抗原産生異常を伴う疾病とは、特に限定は無いが、例えば自己反応性T細胞、自己反応性B細胞により惹起される自己免疫疾患、関節リウマチ等が例示され、WO 97/0965公報に記載の疾病を含むものである。

シクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩はインターロイキン-10産生増強作用、遅延型過敏反応抑制作用、リンパ球幼若化反応抑制作用、混合リンパ球反応抑制作用、IgE産生抑制作用、カラゲナン浮腫抑制作用等の



免疫調節作用を有し、シクロペントノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物を有効成分とする免疫調節剤はこれらの免疫系、免疫因子の異常が起因となる疾病の治療剤又は予防剤として有用である。

すなわちインターロイキン-10の産生低下によりTh1が活性化され、Th1優位な自己免疫の炎症が惹起される。この炎症は腎炎、肝炎等臓器特異的自己免疫疾患、及び移植片拒絶反応やアレルギー性接触性皮膚炎等の疾患に関与している。前記免疫調節剤はインターロイキン-10の産生を増強させ、Th1の活性を抑制することにより、これらの疾患の治療又は予防に有用である。

またリンパ球幼若化反応とは、マイトジェンがリンパ球表面の受容体に結合し、リンパ球を活性化させ、その分裂、増殖を促す反応である。混合リンパ球反応とは、同種異系の動物より得られたリンパ球を混合培養することにより、主要組織適合抗原の不一致によるリンパ球の活性化が誘導され、リンパ球の分裂、増殖が促進される反応である。前記免疫調節剤はこれらの反応を抑制し、リンパ球の異常亢進が起因となる自己免疫性疾患、例えば慢性腎炎、慢性大腸炎、1型糖尿病、慢性関節リウマチ等の慢性の疾患の治療又は予防に特に有用であり、また移植片拒絶反応の抑制においても有用である。

カラゲナン足浮腫モデルは、起炎剤であるカラゲナンを足蹠部に皮下注射することにより、マクロファージ、好中球等の炎症細胞が誘導され、これらの細胞から産生された炎症性の因子により血管透過性が亢進し、浮腫が惹起される反応である。前記免疫調節剤の浮腫抑制作用は、血管透過性の亢進の制御を必要とする疾患、例えば慢性関節リウマチの治療又は予防に有用である。

喘息やアトピー性皮膚炎に代表されるアレルギー疾患においてはマスト細胞からのケミカルメディエーターの放出がアレルギー反応において大きな役割を果たす。この反応はヒスタミンが細胞膜上のヒスタミン受容体に結合し、架橋することによって

引き起こされ、細胞が脱顆粒し、炎症性因子が放出される。アレルギー疾患、例えば気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、アレルギー性結膜炎、じん麻疹、ア

ナフィラキシーショック等の症状改善及び／又は疾患予防に極めて有用である。また前記免疫調節剤は遅延型過敏反応を抑制し、遅延型過敏反応を伴う疾病、例えば接触性過敏症、アレルギー性接触性皮膚炎、細菌アレルギー、真菌アレルギー、ウイルスアレルギー、薬物アレルギー、甲状腺炎、アレルギー性脳炎等の治療、予防において有用である。

本発明においてはシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩、シクロペンテノンを含む加熱処理物、及び該加熱処理物からの部分精製シクロペンテノンから選択される原料を使用し、抗リウマチ作用、抗炎症作用、腫瘍壊死因子産生抑制作用、インターロイキン-10産生増強作用、一酸化窒素産生抑制作用、滑膜細胞へのアポトーシス誘発作用、ファス抗原産生誘導作用、免疫調節作用、例えば遅延型過敏反応抑制作用、リンパ球幼若化反応抑制作用、混合リンパ球反応抑制作用、IgE産生抑制作用、トポイソメラーゼ阻害作用等を有する機能性食品又は飲料、例えばリウマチ改善用食品又は飲料、炎症改善用食品又は飲料、腫瘍壊死因子産生抑制用食品又は飲料、インターロイキン-10産生増強用食品又は飲料、一酸化窒素産生抑制用食品又は飲料、ファス抗原産生誘導用食品又は飲料、免疫調節用食品又は飲料、IgE産生抑制用食品又は飲料、トポイソメラーゼ阻害用食品又は飲料を提供することができる。

本発明の食品又は飲料の製造法は、特に限定はないが、調理、加工及び一般に用いられている食品又は飲料の製造法による製造を挙げることができ、製造された食品又は飲料に抗リウマチ作用等の生理作用を有するシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される1以上の化合物が有効成分として含有されていれば良く、シクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される1以上の化合物を含む、添加及び／又は希釈してなる食品又は飲料は本発明の食品又は飲料と定義される。

本発明の食品又は飲料としてはシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される1以上の化合物が有効成分として含有、添加及び／又は希釈されていれば特にその形状に限定は無く、タブレット状、顆粒状、カプセル状、ゲル状、ゾル状等の形状の経口的に摂取可能な形状物も包含する。

本発明の食品又は飲料は生理活性を有するシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物の抗リウマチ作用、抗炎症作用、腫瘍壊死因子産生抑制作用、インターロイキン-10産生増強作用、一酸化窒素産生抑制作用、フェス抗原産生誘導作用、免疫調節作用、例えば遅延型過敏反応抑制作用、IgE産生抑制作用、トポイソメラーゼ阻害作用等によって、これらを摂取することによりシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩に感受性を示す疾病の症状改善効果又は該疾病の予防効果を有する健康食品又は飲料であり、生体の恒常性の維持に有用な食品又は飲料である。

以上、本発明により、食品又は飲料中に生理活性を有するシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はその塩の適量を含むことが可能となった。これらの化合物が有する生理作用、例えば滑膜細胞へのアポトーシス誘発作用、フェス抗原産生誘導作用、腫瘍壊死因子産生抑制作用、NO産生抑制作用、リウマチ特に慢性関節リウマチの症状改善作用及び/又は予防作用等によって、本発明の食品又は飲料はリウマチ、リウマチに伴う合併症状、歩行困難等の症状の改善又は予防に極めて有用である。

本発明で使用する化合物はその生理活性の有効量の投与を行っても毒性は認められず、例えば経口投与の場合シクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩は100mg/kgでラットに単回投与しても死亡例は認められない。

#### 実施例

以下、実施例を挙げて、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に何ら限定されるものではない。なお、実施例における%は重量%を意味する。

#### 参考例 1

シクロペンテノン(10g)を水(100ml)に溶解し、この溶液に塩化ナトリウム(10g)を加えて混合液を調製した。この混合液に上層40mlを加えて混合後、遠心によって得た上清を減圧下約10mlまで濃縮した。

上記抽出液をカラムクロマトグラフィー用シリカゲルBW-300SP (2×28 cm、富士シリシア化学社製) にアプライし、酢酸ブチル：酢酸：水＝3：2：2の上層を溶離液としてコンプレッサーで0.2 kg/cm<sup>2</sup> に加圧し、毎分5 mlの流速で分離を行った。1画分当り10 mlになるようにフラクションを行い、各画分の一部をとって薄層クロマトグラフィーで分析したところ61番から80番までの画分に高純度のシクロペンテノンが含まれていた。これらの画分を集めて減圧下濃縮した後40 mlのクロロホルムで抽出し、抽出液を減圧下濃縮することによって100 mgのシクロペンテノンを得た。

この画分をパルパックタイプSカラムを用いた順相HPLCで分離し、215 nmの紫外線吸収で検出したところ、純度は98%であった。

上記シクロペンテノン113.9 mgをエタノール2.85 mlに溶かした。このエタノール溶液にヘキサン／エタノール (94/6) 3.85 mlを更に加え、17 mg/mlのシクロペンテノン溶液を調製した。この液を0.5 μmのフィルターでろ過し、光学分割 HPLC 試料溶液とした。

この試料溶液を以下の条件で光学分割 HPLC を行い、前ピークの(−)体シクロペンテノン及び後ピークの(+)体シクロペンテノンのフラクションをそれぞれ集め、減圧乾固し、(−)体シクロペンテノン 43.2 mg、(+)体シクロペンテノン 43.0 mgをそれぞれ得た。

#### 光学分割 HPLC 条件

カラム：キラルパック AS (ダイセル化学工業) 2.0 cm× 25.0 cm

カラム温度：40℃

移動相：ヘキサン／エタノール (94/6)

流速：14.0 ml/min

検出：UV 210 nm

試料注入量：150 μl (2.55 mg)

得られた(−)体シクロペンテノン及び(+)体シクロペンテノンは両者共に約1%のエナンチオマーを含有していたため再度上記の条件で光学分割した。その結果、前ピークの(−)体シクロペンテノン30.0 mg から19.7 mgのエナンチ

オマーを含有しない(−)体シクロペンテノン、後ピークの(+)体シクロペンテノン37.4 mg から 27.7 mgのエナンチオマーを含有しない(+)体シクロペンテノンをそれぞれ得た。なお(−)体シクロペンテノン及び(+)体シクロペンテノンの光学分割HPLCの溶出時間はそれぞれ33分、40分であった。

#### 実施例 1

5年前に慢性関節リウマチと診断され、治療薬としてステロイド剤、抗リウマチ剤、鎮痛消炎剤により、慢性関節炎リウマチの治療を受けてきたが、CRP定量値 3 mg/dl以上、RF定量値 300 U/ml以上、血沈 20 ml/hr以上と症状の改善が見られず、歩行困難のためほとんど寝たきりの状態であった女性(56才)が、後記実施例12-(2)で得られた飲料を毎日50 ml(シクロペンテノン2 mg含有)、1ヵ月飲用した結果、CRP定量値、RF定量値、血沈等の慢性関節リウマチ症状の血液学的な改善が認められた。またこれらの数値の低下と共に、歩行等日常生活における運動機能が顕著に改善された。

#### 実施例 2

慢性関節リウマチ患者の滑膜から樹立された線維芽細胞株であるDSEK細胞(埼玉医科大学総合医療センター第2内科保存細胞株)を10%ウシ胎児血清(FBS、ギブコ社製、26140-079)含有イスコブ改変ダルベッコ培地(IMDM、ギブコ社製、12440-053)で5%炭酸ガス存在下、37℃でコンフルエントになるまで培養し、トリプシン-EDTA(ギブコ社製、25300-054)で細胞をはがして集めた。この細胞を25000個/mlとなるように上記培地に懸濁し、96穴マイクロタイタープレート(各ウェルに100 µlずつ分注した。培養5日後、ほぼコンフルエントになった時点で培地を捨て、2.5、5、10、20又は30 µM シクロペンテノンを含む上記培地を加えた。24時間又は48時間培養後、10 µlのプレミックスWST-1(宝酒造社製、1110100)を加えて2時間反応させ、450 nmに於ける

光増殖度として

その結果は表1の通りであった

表 1

濃度 ( $\mu\text{M}$ )	$A_{450} - A_{650}$	
	24時間	48時間
0	0.846	1.270
2.5	0.724	0.956
5	0.530	0.541
10	0.325	0.216
20	0.247	0.192
30	0.253	0.187

24時間培養、48時間ともに5 $\mu\text{M}$ 以上のシクロペンテノンを追加した区分で水添加の対照に比べて細胞増殖が抑制されており、10 $\mu\text{M}$ のシクロペンテノンを追加した区分でアポトーシス小体の形成が見られた。20 $\mu\text{M}$ 以上のシクロペンテノンを追加した区分では生細胞はほとんど見られなかった。

以上、シクロペンテノンは滑膜細胞にアポトーシス誘発作用、増殖抑制作用を示した。また(−)体シクロペンテノン、(+)体シクロペンテノンについても同様の結果を得た。

### 実施例 3

(1)  $5 \times 10^5$  個/mlのヒトT細胞性白血病細胞株であるJurkat細胞(ATCC TIB-152)及びMolt-3細胞(ATCC CRL-1552)を10%ウシ胎児血清(FCS、バイオウィタカー社製)を含むRPMI 1640培地(ギブコBRL社製)にて、5%  $\text{CO}_2$  存在下、37℃で培養し、0、5、10又は20 $\mu\text{M}$ のシクロペンテノンを添加して更に24時間培養した。細胞増殖はMTT法〔モスマン(Mosmann)ら、ジャーナル オブ イムノロジカル メソッズ(J. Immunol. Methods)、第65

巻、第55～63頁(1983)]を用い、細胞増殖度を560nmにおける吸光度で測定した。

その結果、水添加の対照に比べて両細胞株とも10 $\mu$ M シクロペンテノン添加区分では約50%、20 $\mu$ M シクロペンテノン添加区分では75%以上、細胞増殖が抑えられた。5 $\mu$ M以下のシクロペンテノンを添加しても細胞の増殖に有意な影響はなかった。

以上のように、シクロペンテノンはT細胞性白血病細胞株であるJ u r k a t細胞及びM o l t - 3細胞の増殖を濃度依存的に抑制した。

その結果を図1と図2に示す。すなわち、図1はJ u r k a t細胞の増殖に対するシクロペンテノンの影響を示す図であり、図2はM o l t - 3細胞の増殖に対するシクロペンテノンの影響を示す図である。図1と図2において、横軸はシクロペンテノン濃度( $\mu$ M)を、縦軸は560nmにおける吸光度を示す。

(2) J u r k a t細胞及びM o l t - 3細胞におけるファス抗原発現(産生誘導)に対するシクロペンテノンの影響を以下のようにして測定した。0、1、5、10又は20 $\mu$ Mのシクロペンテノンを含む10%FCS含有RPMI1640培地で $5 \times 10^5$ 個/mlのJ u r k a t細胞又はM o l t - 3細胞を5%

CO<sub>2</sub>存在下、37℃で24時間培養し、ムンカー(M u n k e r, R.)の方法[アナルズ オブ ヘマトロジー(Ann. Hematol.)第70巻、第15～17頁(1995)]に従って抗ファス抗体(ベーリンガー・インゲルハイム社製)を用いて、2ステップ免疫染色した。

染色した細胞 $1 \times 10^4$ 個の蛍光強度をフローサイトメーター(オーソサイトロン; オーソ・ダイアグノスティック・システムズ社製)を用いて測定し、一定値以上の蛍光強度を示す細胞をファス抗原発現細胞としてその比率を計算した。

その結果、両細胞株において、シクロペンテノンを添加した場合には1～20

細胞におけるファス抗原発現を示す図である。図3と図4において横軸はシクロペンテノンの濃度( $\mu$ M)、縦軸はファス抗原発現細胞の比率(%)を示

し、シクロペンテノンによるファス抗原産生誘導作用が確認された。

(3)  $10 \mu\text{M}$ シクロペンテノンを添加してM o l t - 3細胞を1、3、6、12又は24時間培養し、ファス抗原発現細胞の比率を測定した。

その結果、 $10 \mu\text{M}$ シクロペンテノンを添加した場合、ファス抗原発現細胞の比率は培養1時間後から上昇して24時間後まで徐々に上昇した。

その結果を図5に示す。すなわち図5はM o l t - 3細胞に $10 \mu\text{M}$ シクロペンテノンを添加して培養したときのファス抗原発現細胞の比率の変化を示す図であり、横軸は培養時間(時間)、縦軸はファス抗原発現細胞の比率(%)を示す。

以上、実施例3-(1)～(3)に記載のように、シクロペンテノンによるファス抗原産生誘導作用が確認された。また(-)体シクロペンテノン、(+)体シクロペンテノンで同様の結果を得た。

#### 実施例 4

6週齢の雄性ルイスラット(セアック吉富社より5週齢、体重約130gで購入し、1週間の予備飼育)を用い、慢性関節リウマチ動物モデルであるカラゲナン誘発足浮腫モデルを次のように作製し、被験薬を評価した。

実験開始18時間前から絶食したラットに蒸留水(大塚製薬社製)で1、5mg/mlとなるよう調整したシクロペンテノンを10ml/kgの投与量で経口投与した。

被験薬投与0.5時間後に生理食塩水(大塚製薬社製)に懸濁して1%の濃度に調整したカラゲナン(ワコー社製)を100 $\mu\text{l}$ /ラットで右足足蹠に注射し、足浮腫を惹起した。カラゲナン注射3時間後にラットの右足容積をラット足容積測定装置(ウゴバジール社製)で測定した。なお測定値はカラゲナン投与前に測定した各ラットの右足容積から増加率を算定して表示した。

その結果を図6に示す。すなわち図6はシクロペンテノンと足浮腫増加率の関係を示す図であり、縦軸は増加率(%)、横軸はシクロペンテノン量(mg/kg)を示す。

シクロペンテノンは50mg/kgの投与量において有意な足浮腫抑制作用を



示した。また（－）体シクロペンテノン、（＋）体シクロペンテノンで同様の効果を得た。

#### 実施例 5

（１）２０週令の雌性ＣＤＦ１系マウスに生理食塩水に溶解したサルモネラアボータス イーウイー（*Salmonella abortus equi*）由来のＬＰＳ（リポポリサッカライド：シグマ社製、Ｌ-2012）を腹腔内投与（ $0.1\text{ mg/kg}$ ）し、エンドトキシンショックモデルを作製した。

シクロペンテノンはＬＰＳ投与の３０分前に $30\text{ mg/kg}$ の用量で腹腔内投与あるいは経口投与した。一方、対照群は無処置とした。ＬＰＳ投与９０分後にマウスより血液を採取し、血清を分離した。次に血清中の腫瘍壊死因子量をＴＮＦ- $\alpha$ ・ＥＬＩＳＡキット（ジェンザイム社製）にて測定し、シクロペンテノン投与による腫瘍壊死因子産生抑制効果を測定した。

その結果を表２に示す。すなわち、対照群に対し、シクロペンテノン投与群では腹腔内投与群、経口投与群のいずれの群においても、血清中の腫瘍壊死因子の濃度は低値であり、シクロペンテノン投与により、腫瘍壊死因子の産生が有意に抑制されていた。

表 2

群	匹数	血清中 TNF- $\alpha$ ( $\text{ng/ml}$ )			
		平均	$\pm$	SE	
対照群	5	3.96	$\pm$	0.52	
シクロペンテノン腹腔内投与群	5	0.58	$\pm$	0.08	**
シクロペンテノン経口投与群	5	1.80	$\pm$	0.20	*

\*\*  $p < 0.01$  で対照群に対し有意

\*  $p < 0.01$  で対照群に対し有意

(2) 8週齢の雌性CDF1系マウスを用いLPSを腹腔内投与(10 $\mu$ g/マウス)し、エンドトキシンショックモデルを作製した。シクロペンテノン(LPS投与の15分前に、0.03、0.3、3、30mg/kgの用量で皮下投与した(一群4匹)。LPS投与1時間後にマウスより採血し、血清を分離し、血清中腫瘍壊死因子 $\alpha$ 量及びインターロイキン-10量を市販のELISAキット(エンドジェン社製)にて測定した。

その結果を表3に示す。すなわち、LPS投与による血清中の腫瘍壊死因子 $\alpha$ 濃度の上昇を、シクロペンテノンは用量依存的に抑制した。また、シクロペンテノン30mg/kg投与群において蒸留水を投与したコントロール群(一群4匹)に対し、血清中のインターロイキン-10濃度を有意に上昇させた。

表 3

	投与量 mg/kg	腫瘍壊死因子量 (ng/ml)	血清インターロイキン-10量 (ng/ml)
		平均 $\pm$ SD	平均 $\pm$ SD
対照群		3.00 $\pm$ 0.30	1.79 $\pm$ 0.29
シクロ ペンテ ノン投 与群	30	0.24 $\pm$ 0.08	3.16 $\pm$ 0.28
	3	1.41 $\pm$ 0.45	1.95 $\pm$ 0.20
	0.3	2.30 $\pm$ 0.24	1.32 $\pm$ 0.16
	0.03	2.68 $\pm$ 0.28	1.58 $\pm$ 0.29

(3) 8週齢の雌性CDF1系マウスの腹腔内にパラフィンオイル(コスモバイオ社)2mlを投与し、腹腔M $\phi$ を誘導した。パラフィンオイル投与1週間後にマウスの腹腔内にRPMI-1640 培地(ギブコ社)4mlを注入しよくマッサージした後回収し、腹腔細胞を得た。

腹腔細胞はRPMI-1640 培地で2回洗浄した後、10%牛胎児血清(FCS:ハイ

クローン社)を含んだRPMI-1640 培地に懸濁し、細胞濃度を  $1 \times 10^6$  cells/ml に調整した。調整した細胞液 1 ml を 24 穴プレートに播取し、 $37^\circ\text{C}$   $\text{CO}_2$  インキュベーターで 2 時間培養した。培養後上清に含まれる非接着細胞を除去し、接着細胞を腹腔Mφとして用いた。

プレートの各穴に 10% FCS を含んだ RPMI-1640 培地  $800 \mu\text{l}$  を加え、次いで生理食塩水(大塚製薬社製)に溶解した 1、10、100  $\mu\text{M}$  のシクロペントノンを  $100 \mu\text{l}$  添加し  $37^\circ\text{C}$   $\text{CO}_2$  インキュベーターで 1 時間培養した。

培養後 100 ng/ml の LPS を  $100 \mu\text{l}$  添加し、更に 24 時間培養した。培養終了後、培養上清を回収し産生された腫瘍壊死因子- $\alpha$  量を市販の ELISA キット(エンドジェン社製)を用いて定量した。

その結果を図 7 に示す。すなわち図 7 はシクロペントノンと腫瘍壊死因子産生量の関係を示す図であり、縦軸は腫瘍壊死因子量 (pg/ml)、横軸は各試料のシクロペントノン濃度 ( $\mu\text{M}$ ) を示す。

シクロペントノンは 10  $\mu\text{M}$  以上の濃度において LPS が誘発するマウス腹腔マクロファージからの腫瘍壊死因子産生を著明に抑制した。

以上、実施例 5-(1)～(3)で示すようにシクロペントノンは腫瘍壊死因子産生抑制作用、インターロイキン-10 産生増強作用を示した。また(一)体シクロペントノン、(+ )体シクロペントノンについても同様の結果を得た。

#### 実施例 6

シクロペントノンの NO 産生の抑制活性及び細胞障害抑制活性をマウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞(ATCC TIB 71)及び LPS を用い、以下のように測定した。

$1.5 \times 10^6$  個の RAW264.7 細胞を含む 5ml の 10% ウシ胎児血清(ギブコ社製)含有フェノールレッド不含 2mM L-グルタミン(ライフテックオリエンタル社製、25

存在  $37^\circ\text{C}$  で 12 時間培養した後、50  $\mu\text{l}$  の 50 ng/ml LPS(シグマ社製)を加え、各反応液に各々 50  $\mu\text{l}$  の 500  $\mu\text{M}$  シクロペントノン、250  $\mu\text{M}$  シクロペ

ンテノン、100  $\mu$ M シクロペンテノン、50  $\mu$ M シクロペンテノンを加えて、更に12時間培養した後、NOが培地中で酸化されることによって生ずる  $\text{NO}_2^-$  及び生細胞数の測定を行った。なお、対照としてLPSを加えない区及びシクロペンテノンを加えない区を設定した。

$\text{NO}_2^-$  の測定には各ウエルから100  $\mu$ l の培養上清を分離し、10  $\mu$ l の50  $\mu$ g/ml 2,3-ジアミノナフタレン（同仁化学研究所社製、341-07021）溶液（0.62 N 塩酸溶液）を加え室温で15分間放置し、5  $\mu$ l の2.8 N水酸化ナトリウム水溶液を加え、生じたナフタレントリアゾールの蛍光をタイターテックフルオロスキヤンII（大日本製薬社販売）を用いて励起波長355nm、測定波長460nmにて測定した。実験はすべて2連で行い、この平均値からLPS非添加の対照値を控除して、LPS添加区分の値に対する各区分の相対値で比較した。

その結果、シクロペンテノンはLPSによりRAW264.7細胞に誘導されるNO産生を抑制し、更に、LPSによるRAW264.7細胞に対する細胞障害を抑制した。

その結果を図8、図9に示す。図8は培養液中のシクロペンテノン濃度と  $\text{NO}_2^-$  濃度の関係を示す図であり、縦軸は  $\text{NO}_2^-$  濃度の相対値（%）を示す。図9はシクロペンテノン存在下の培養時間と生細胞数の関係を示す図であり、縦軸は培養液5ml中に含まれる生細胞数（ $\times 10^5$ 個/5ml）を示し、横軸は培養時間（時間）を示す。図9において、白四角（□）はコントロールを、白ひし形（◇）はLPSを、白丸（○）は5  $\mu$ M シクロペンテノンを、白三角（△）は5  $\mu$ M シクロペンテノン+LPSを、黒四角（■）は2.5  $\mu$ M シクロペンテノン+LPSを、黒ひし形（◆）は1  $\mu$ M シクロペンテノン+LPSを、黒丸（●）は0.5  $\mu$ M シクロペンテノン+LPSを表す。

以上、シクロペンテノンはNO産生抑制作用を示した。また（-）体シクロペンテノン、（+）体シクロペンテノンも同様の効果を示した。

#### 実施例 7

（1）1群5匹の5週令のBALB/c系雄性マウス（日本クレア社）に、卵白アルブミン（シグマ社）の0.01%生理食塩水溶液100  $\mu$ l 及びアラム（Alum）〔商品名イムジェクト アラム（Imject Alum）；ピラス社〕100  $\mu$ l を腹腔内

投与して感作し、その11日後に眼低静脈より末梢血を採取した。

採取した血液は遠心分離（2000rpm, 5分）後、血漿を分離し、ELISA（IgE マウス EIA キット；生化学工業）で血漿中総 IgE量を測定した。

シクロペンテノン投与群は抗原感作日から採血前日まで 10mg/kgを1日1回強制経口投与した。

また対照群では蒸留水を同様に経口投与し、非感作群を無処置群とした。

その結果を表4に示す。卵白アルブミン感作による血漿中総 IgE量の上昇はシクロペンテノンの投与により抑制された。

表 4

	血漿中総 IgE量 (ng/ml)
	平均 ± SEM
無処置群	0
対照群	742.6 ± 366.0
シクロペンテノン投与群	355.8 ± 127.5

(2) 1群5匹の5週令のWistar系雄性ラット（日本エスエルシー社）に、卵白アルブミン（シクマ社）の0.01%生理食塩水溶液100  $\mu$ l 及びアラム（Alum）〔商品名イムジェクト アラム（Imject Alum）；ピラス社〕100  $\mu$

を腹腔内に注射し、1週間後、同様に卵白アルブミンとアラムを腹腔内に投与した。

受身皮膚アッセイ法（PCA）反応で抗原特異的IgE量を測定した。

すなわち血漿の倍々希釈系列を4倍から64倍まで、生理食塩水を用いて作製

し、毛刈りした7週令のWister系雄性ラットの背部の皮内に0.1mlずつ注射した。皮内注射の48時間後、0.05%卵白アルブミン及び0.5%エバンスブルー（ナカライテスク社製）の混液1mlを尾静脈より注射した。尾静脈注射30分後、ラットを断頭、放血死させ、背部に現れた青色スポットを観察し、直径5mm以上のスポットを陽性とし、最高希釈度をIgE力価として表した。

シクロペンテノン投与群は抗原感作日から3日間、1mg/kgあるいは10mg/kgのシクロペンテノンを1日1回腹腔内投与した。また対照群では蒸留水を同様に腹腔内投与した。

その結果を表5に示す。

表 5

	IgE力価
対照群	64
シクロペンテノン投与群 1mg/kg/日	16
10mg/kg/日	<4

卵白アルブミン感作による抗原特異的IgE量の上昇は用量依存的にシクロペンテノンの投与により抑制された。

以上、シクロペンテノンによりIgE産生が抑制された。また（-）体シクロペンテノン、（+）体シクロペンテノン同様のIgE産生抑制活性が認められた。

。

## 実施例 8

(1) C57BL/6 マウス（メス、5週令）は日本エスエルシー社より購入し、1週間の予備飼育の後、実験に用いた。遅延型過敏反応の惹起抗原であるヒツジ赤血球（清水実験材料）を生理食塩水（大塚製薬社製）で3回洗い  $1 \times 10^9$  cells/ml に調整し、 $200 \mu\text{l}$  をマウスの腹腔内に注射して抗原感作した。

感作から5日後に同様に調製した抗原  $40 \mu\text{l}$  を右足足蹠に注射して抗原誘発し、足浮腫を惹起した。シクロペンテノン<sup>1</sup>は1群5匹のマウスに抗原感作日から1日1回、3日間腹腔内に  $1 \text{ mg/kg}$  又は  $10 \text{ mg/kg}$  を投与した。

抗原誘発から2日後にマウスの右足容積を足浮腫測定装置（ウゴバジル社製）で測定し、遅延型過敏反応の指標とした。測定値は抗原誘発前に測定したマウスの右足容積からの増加率を算定して表示した。

その結果を図10に示す。すなわち図10はシクロペンテノンの遅延型過敏反応抑制作用を示す図であり、縦軸は増加率（%）、横軸はシクロペンテノン投与量（ $\text{mg/kg}$ ）を示す。なお図中\*\*は対照に対して  $p < 0.01$  で有意であることを意味する。

シクロペンテノンは  $1 \text{ mg/kg}$  の投与で、遅延型過敏反応を抑制し、 $10 \text{ mg/kg}$  の投与で有意な遅延型過敏反応抑制作用を示した。

また（-）体シクロペンテノン、（+）体シクロペンテノンも同様の効果を示した。

(2) C3H/HeJ マウス（日本エスエルシー社；オス、5週令）より脾臓を摘出し、細かく粉碎して10%牛胎児血清（ハイクローン社製）を含んだRPMI-1640培地（ギブコ社製）に懸濁して単細胞液を得た。細胞浮遊液をプラスチックシャーレに播種し  $37^\circ\text{C}$  で炭酸ガス培養器で2時間培養し、接着性細胞をシャーレに接着させて除き、非接着性細胞を脾臓リンパ球として用いた。細胞懸液を  $1 \times 10^6$  cells/ml に調整し、96ウェルマイクロタイタレーションプレート（コスタ）に  $100 \mu\text{l}$  を接種し、 $37^\circ\text{C}$  で炭酸ガス培養器で2日間培養した。培養上清を採取し、ELISAに用いた。

シクロペンテノンを添加し、さらに  $10^{-6}$  M の  $\text{Ca}^{2+}$  阻害剤 EGTA（Calbiochem）を添加し、さらに  $10^{-6}$  M の  $\text{Mg}^{2+}$  阻害剤 EDTA（ナカライテスク社製）を添加し  $37^\circ\text{C}$  で炭酸ガス培養器で1日間培養した。培養上清を採取し、ELISAに用いた。

養後  $1 \mu\text{Ci}$  の  $^3\text{H}$ -チミジン を各ウェルに加えさらに 1 日間培養して細胞への取り込み量を液体シンチレーションカウンターで測定した。

その結果を図 1 1 に示す。すなわち図 1 1 はシクロペンテノンのリンパ球幼若化抑制作用を示す図であり、縦軸は  $^3\text{H}$ -チミジン取り込み量 (CPM)、横軸は Con A の添加、非添加の対照、及びシクロペンテノンの濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を示す。図から明かなように、シクロペンテノンはマイトジェン刺激のマウスリンパ球の幼若化に対し、用量依存的な抑制作用を示し、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  でほぼ完全にリンパ球の増殖を抑え、リンパ球の活性化に対する抑制作用が認められた。

また (-) 体シクロペンテノン、(+) 体シクロペンテノンも同様な効果を示した。

(3) BALB/c マウス (日本エスエルシー社; オス、5 週令) および C57BL/6 マウス (日本エスエルシー社; オス、5 週令) より脾臓を摘出し、上記の方法により脾臓リンパ球を得た。各細胞浮遊液の濃度を  $2 \times 10^6$  細胞/ $\text{ml}$  に調整し、 $100 \mu\text{l}$  づつを混合して 96 ウェルマイクロタイタープレートに播種した。対照群以外の各ウェルに、各濃度のシクロペンテノンを添加し、 $37^\circ\text{C}$  で炭酸ガス培養器で 4 日間培養した。培養後  $1 \mu\text{Ci}$  の  $^3\text{H}$ -チミジン を各ウェルに加えさらに 1 日間培養して細胞への取り込み量を液体シンチレーションカウンターで測定した。

その結果を図 1 2 に示す。すなわち図 1 2 はシクロペンテノンの混合リンパ球反応抑制作用を示す図であり、縦軸は  $^3\text{H}$ -チミジン取り込み量 (CPM)、横軸は BALB/c 脾臓リンパ球の対照 (図中、BALB/c で示す)、C57BL/6 脾臓リンパ球対照 (図中、C57BL/6 で示す)、BALB/c 脾臓リンパ球と C57BL/6 脾臓リンパ球混合対照 (図中、Mix で示す) 及びシクロペンテノンの濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を示す。図から明かなように、アロ抗原刺激により活性化されたリンパ球に対してシクロペンテノンは用量依存的な抑制作用を示し、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  でほぼ完全に抑え、混合リンパ球反応によるリンパ球の活性化に対する抑制作用が認められた。

また (-) 体シクロペンテノン、(+) 体シクロペンテノンも同様の混合リン



パル反応抑制作用を示した。

#### 実施例 9

(1) トポイソメラーゼⅡ〔トポジェン (T o p o G E N) 社製、2単位/ $\mu$ l〕 2  $\mu$ l、10倍濃度緩衝液〔0.5M T r i s-HC l (pH 8.0)、1.2M K C l、0.1M M g C l<sub>2</sub>、5mM アデノシン三リン酸、5mM ジチオスレイトール〕 2  $\mu$ l、0.1% ウシ血清アルブミン (宝酒造社製) 2  $\mu$ l、蒸留水 11  $\mu$ l 及び対照の蒸留水又は試料 (100、200、500、1000又は2500  $\mu$ Mのシクロペンテノン) 2  $\mu$ lを混合したものに、0.25  $\mu$ g/ $\mu$ l p B R 3 2 2 DNA (宝酒造社製) 1  $\mu$ lを添加して37℃で反応させた。30分間反応後、1% ドデシル硫酸ナトリウム、50% グリセロール、0.02% ブロモフェノールブルー水溶液 2  $\mu$ lを添加して反応を停止した。

アガロース L 0 3 (宝酒造社製) と T A E 緩衝液〔40mM T r i s、5mM 酢酸ナトリウム、1mM エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (E D T A)、酢酸でpH 7.8に調整〕を用いて作製した1% アガロースゲルに上記反応液 20  $\mu$ lをアプライし、T A E 緩衝液中で電気泳動を行った。泳動後、ゲルを1  $\mu$ g/ml エチジウムブロミド水溶液に浸漬し、紫外線を照射してDNA電気泳動パターンを観察した。なお、水添加の対照ではDNAが超らせん型から弛緩型に完全に变化するが、トポイソメラーゼⅡ活性が阻害されると超らせん型から弛緩型への変化が一部又は完全に阻害される。

その結果を表6に示す。

表 6

反応液中の濃度 ( $\mu$ M)	阻害活性
0	—
10	—
20	++
50	++
100	+++
250	+++

水添加の対照ではDNAが超らせん型から弛緩型に完全に变化したが、20  $\mu$  M以上のシクロペンテノン濃度でDNAの超らせん型から弛緩型への変化が一部又は完全に阻害され、シクロペンテノンのトポイソメラーゼII阻害活性が確認された。表6において、—は超らせん型から弛緩型に完全に变化していることを、+は中程度の、++は大半の超らせん型が残っていることを、+++は超らせん型が全く減少していないことを示す。

(2) 実施例9-(1)と同様の方法でシクロペンテノンのトポイソメラーゼI阻害活性を測定した。但し、トポイソメラーゼIIの代りにトポイソメラーゼI〔トボジェン社製、0.01単位/ $\mu$ l〕、10倍濃度緩衝液として100 mM Tris-HCl (pH 7.9)、10 mM EDTA、1 mM スペルミジン、50% グリセロールを用いた。また、試料として最終濃度1 mMとなるようシクロペンテノンを添加した。

その結果、1 mM シクロペンテノンでトポイソメラーゼIは阻害された。

以上、正常細胞では分裂期の一過的に発現しているが、がん化により全細胞周期を通じて高発現するようになるトポイソメラーゼIIや、がん化により発現量や活性が増大するトポイソメラーゼIに対しシクロペンテノン阻害活性を示した。また(−)体シクロペンテノン、(+)体シクロペンテノンについても同様

の結果を得た。

#### 実施例 10

##### 注射剤

(1) 生理食塩液（日本薬局法収載品）にシクロペンテノン<sub>2</sub>を1%濃度で加え注射剤を作製した。

(2) 生理食塩水（前記と同じ）に（-）体シクロペンテノン及びグリシルリチン酸をそれぞれ0.5%及び0.1%濃度で加え、注射剤を作製した。

#### 実施例 11

##### 錠剤

(1) シクロペンテノン100mgと微結晶性セルロースの適量とを含有する錠剤を調製し、糖衣を施し、錠剤を作製した。

(2) （+）体シクロペンテノン0.1mg、グリシルリチン酸ジカリウム10mg及び微結晶セルロースの適量とを含有する錠剤を調製し、糖衣を施し、錠剤を作製した。

#### 実施例 12

(1) ペクチン（ポモシンペクチンLM-13CG：ハーキュリーズ社製）5kgを水道水100リットルに添加し、液温28℃から液温120℃となるまで水蒸気吹込みにより35分間昇温させ、次いでかくはん下で120℃、5時間保温し、次いで冷却し、冷却物135リットルを調製した。次いで冷却物にろ過剤として、セライト#545（セライト社製）1.35kg、及びシリカ#600-S（中央シリカ社製）1.35kgを添加し、次いでセライト#545の0.1kg、及びシリカ#600-Sの0.1kgでプレコートしたコンパクトフィルター（6インチ16段ろ紙：ADVANTEC#327）でろ過を行った。得られたろ液はプレートヒーター（日阪製作所製）による連続瞬間加熱処理（9

シクロペンテノン<sub>2</sub>を含有するペクチン加熱処理液のpHは約5.5、酸度は約1.5、糖度は5.0g/100mlであった。なおpHはpHメーターで測定し、酸

度は試料 10 ml を pH 7.0 に中和するのに要する 0.1 N NaOH 量 (ml) で表示した。更に糖度はブリックス糖度計で測定した。

(2) 下記組成で飲料を調製した。

果糖ブドウ糖液糖	5.00%
砂糖	4.00%
酸味料	1.20%
香料	0.30%
シクロペンテノン含有物	0.5%
精製水	残
計	100.00%

なおシクロペンテノン含有物としては実施例 12-(1) 記載のシクロペンテノン含有ペクチン加熱処理液を使用し、その固形物換算量を添加した。この飲料 100 ml 中には 4 mg のシクロペンテノンが含有されている。

#### 発明の効果

本発明によりシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも 1 以上の化合物を有効成分として含有する医薬が提供される。該医薬は抗リウマチ剤又はリウマチ予防剤として、また炎症性サイトカインの制御による抗炎症剤又は炎症予防剤として炎症を伴う疾病の治療剤又は予防剤として極めて有用である。また本発明により、食品又は飲料中に生理活性を有するシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩の適量を含有させることが可能となった。これらの化合物が有する生理機能により本発明の機能性食品又は飲料は、リウマチ特に慢性関節リウマチの症状改善作用及び／又は予防作用によって、リウマチに伴う合併症状、歩行困難等の治療又は予防等に極めて有用である。また炎症性サイトカインの制御作用により、本発明の食品又は飲料は炎症を伴う疾病の症状改善又は予防に有用である。

また本発明の医薬により腫瘍壊死因子の産生が抑制され、本発明の医薬は腫瘍壊死因子の産生により媒介される疾病、該因子の産生により悪化する疾病、敗血症、AIDS、慢性関節性リウマチ、等の疾病の治療又は予防に有用である。ま

た本発明の食品又は飲料は腫瘍壊死因子の産生により媒介される疾病、該因子の産生により悪化する疾病、敗血症、AIDS、慢性関節性リウマチ、等の疾病の症状の改善又は該疾病の予防に極めて有用であり、シクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物を有効成分として使用する本発明の方法は腫瘍壊死因子の産生量の調節に極めて有用である。

更に本発明によりNO産生抑制作用を有するシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩を含有する医薬が提供され、該医薬はNO産生の抑制を必要とする疾病、例えば全身性血圧低下、血圧応答低下、自己免疫疾患、炎症、関節炎、リウマチ性関節炎、炎症性腸疾患、血管機能不全、病理性血管拡張、組織損傷、心臓血管系虚血、痛感過敏症、脳虚血、血管新生を伴う疾病、がんの治療又は予防、及び生体の恒常性の維持に有用な医薬品である。

またNO産生抑制作用を有するシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物を有効成分とするNO産生抑制剤、血管新生抑制剤、発がん予防剤、制がん剤、抗炎症剤、虚血性脳損傷改善剤も提供される。該NO産生抑制剤は生化学研究や、医薬のスクリーニングに有用である。

本発明により、食品又は飲料中に生理活性を有するシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩の適量を含有させることが可能となった。このシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩が有するNO産生抑制作用によって、本発明の食品又は飲料はNO産生抑制作用を介した発がん予防、制がん作用、抗炎症作用、虚血性脳損傷改善作用、生体防御作用増強等の生体の恒常性維持機能を有する健康食品又は飲料である。

本発明によりシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選

等には有用なNO産生誘導方法は、及びNO産生異常を伴う疾病、例えば関節炎、慢性関節性リウマチ、炎症性腸疾患、血管機能不全、病理性血管拡張、組織損傷、心臓血管系虚血、痛感過敏症、脳虚血、血管新生を伴う疾病、がんの治療又は予防、及び生体の恒常性の維持に有用な医薬品である。

またシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物の有効量を含有する食品又は飲料は、これらの化合物が有するファス抗原産生誘導作用により本発明の機能性食品又は飲料であり、上記疾患の症状改善、発病予防作用に極めて有用である。またシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩は滑膜細胞にアポトーシス誘発作用を有し、本発明の医薬、食品又は飲料は抗リウマチ用の医薬、食品又は飲料として特に有用である。

本発明によりIgE産生抑制作用、遅延型過敏反応抑制作用、リンパ球幼若化抑制作用、混合リンパ球反応抑制作用を有するシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも一つの化合物を有効成分として含有する免疫調節剤が提供される。

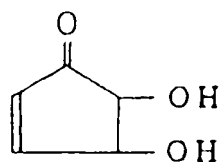
またシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩が有する免疫調節作用により、これらの化合物から選択される化合物を含有する食品又は飲料は免疫調節用食品又は免疫調節用飲料として、自己免疫疾患等の免疫機能の調節を必要とする疾患症状の改善又は免疫異常症の予防に有用である。

また本発明の方法はIgEの産生量の調節、免疫調節等に有用である。

また本発明によりシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも一以上の化合物を有効成分として含有するトポイソメラーゼ阻害剤、これらの化合物から選択される1以上の化合物を有効成分として使用するトポイソメラーゼ阻害方法が提供される。該トポイソメラーゼ阻害剤は制がん剤として有用であり、該トポイソメラーゼ阻害方法は生化学研究や制がん剤のスクリーニング等に有用である。

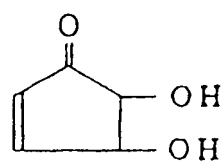
## 請 求 の 範 囲

1. 下記式【1】で表される4,5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物を有効成分として含有することを特徴とする抗リウマチ剤。



【1】

2. 下記式【1】で表される4,5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物を含有することを特徴とするリウマチ改善用食品又は飲料、又はリウマチ予防用食品又は飲料。



【1】

図 1

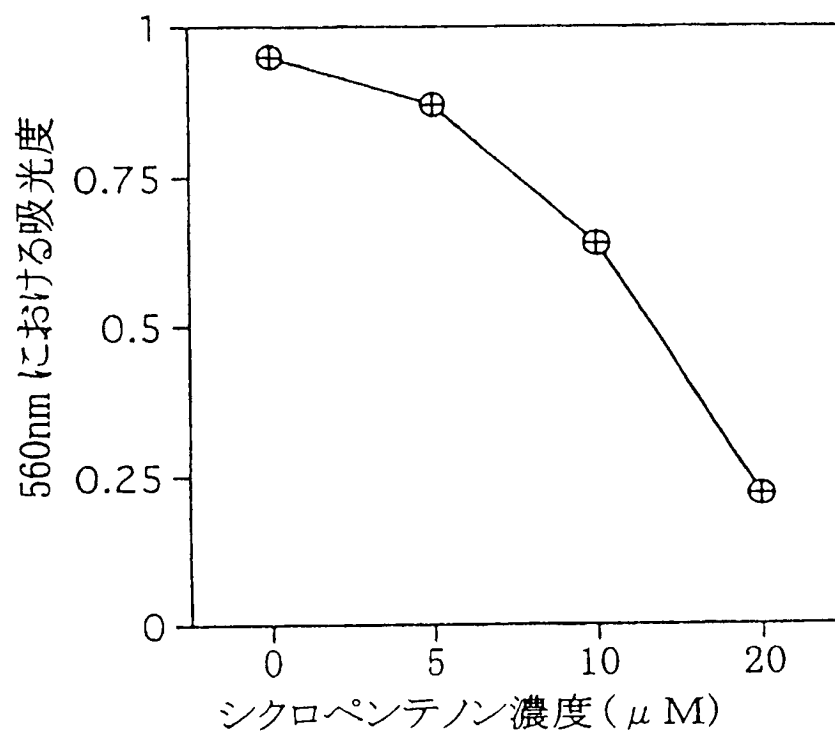




図 2

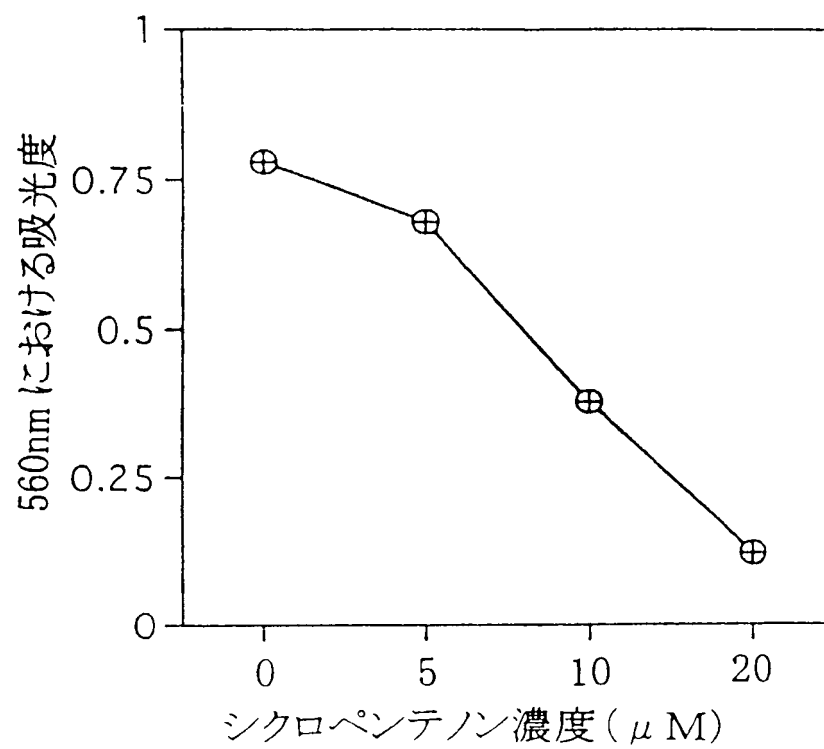


図 3

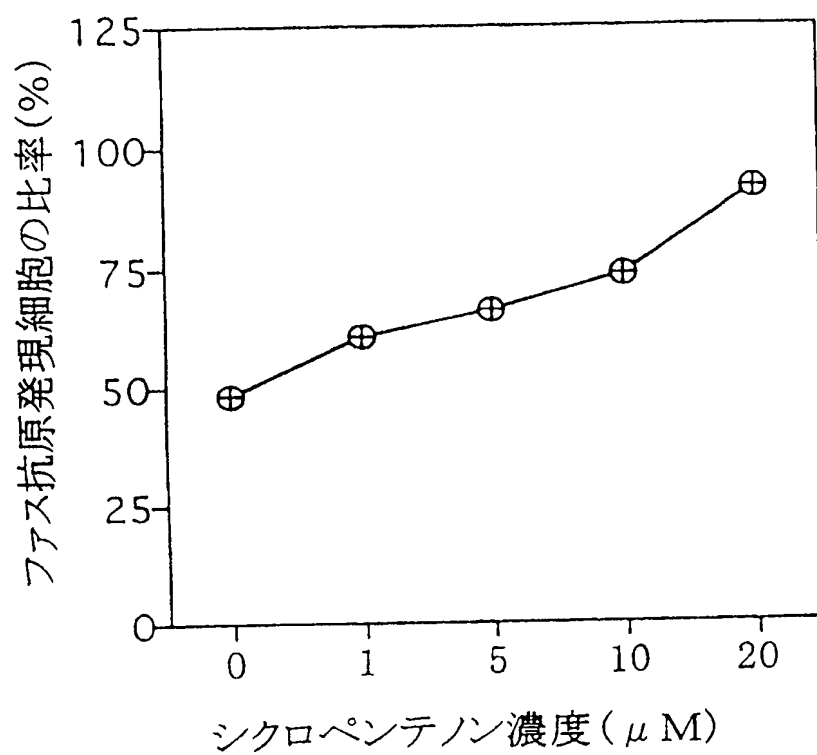


図 4

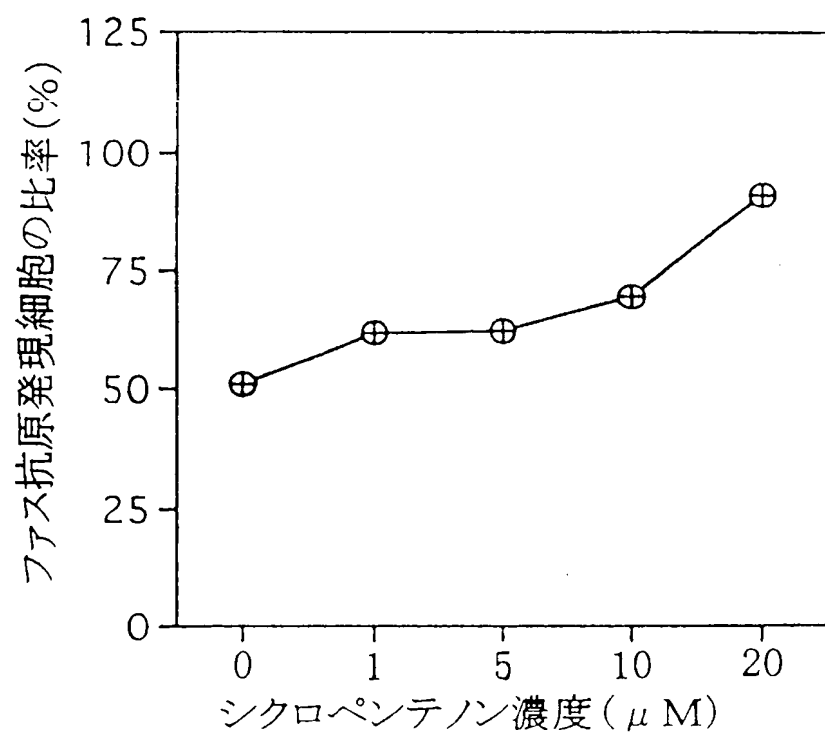


図 5

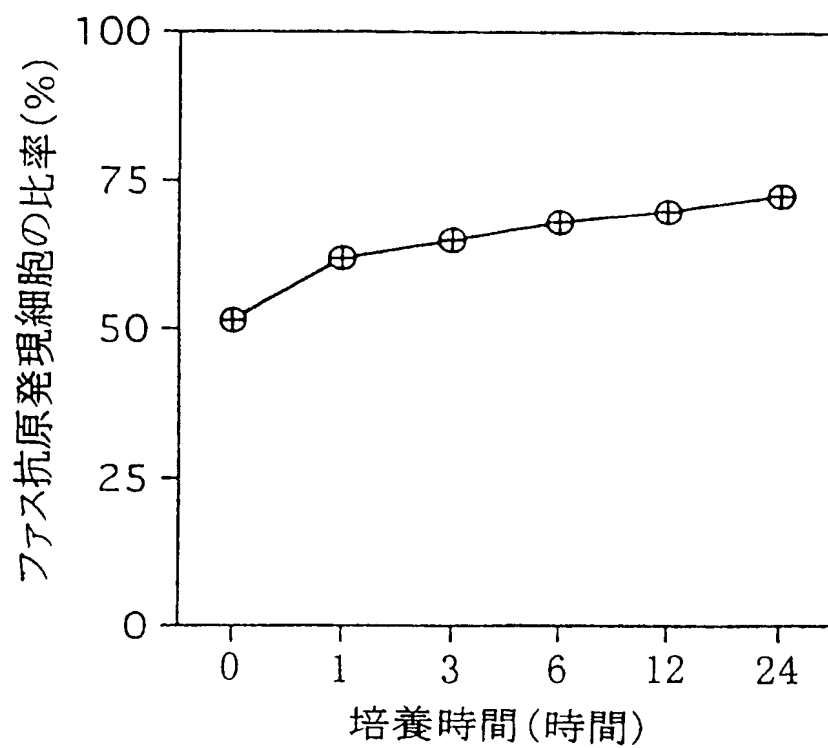


図 6

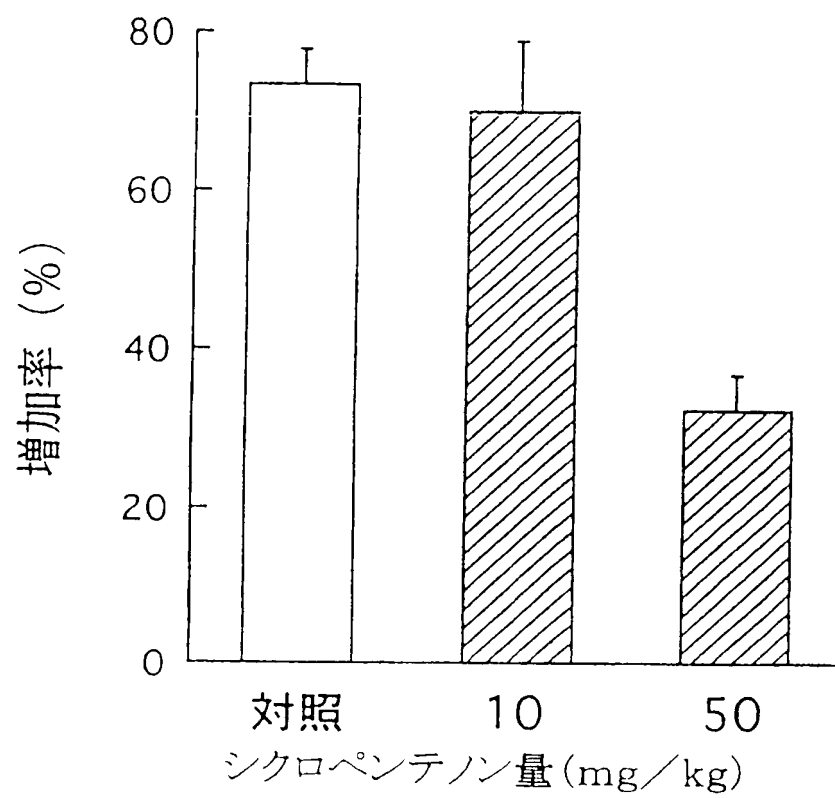


図 7

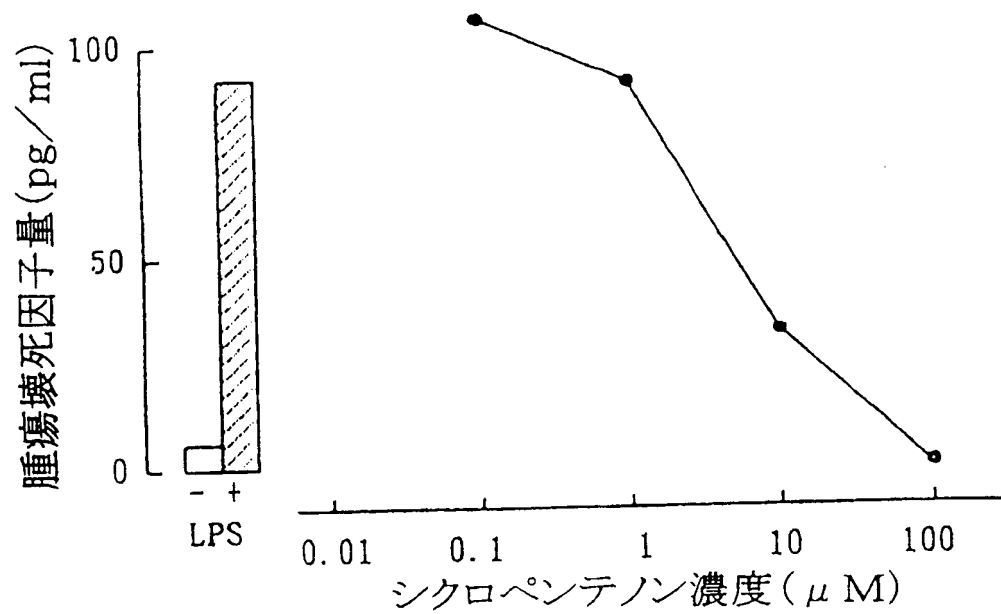
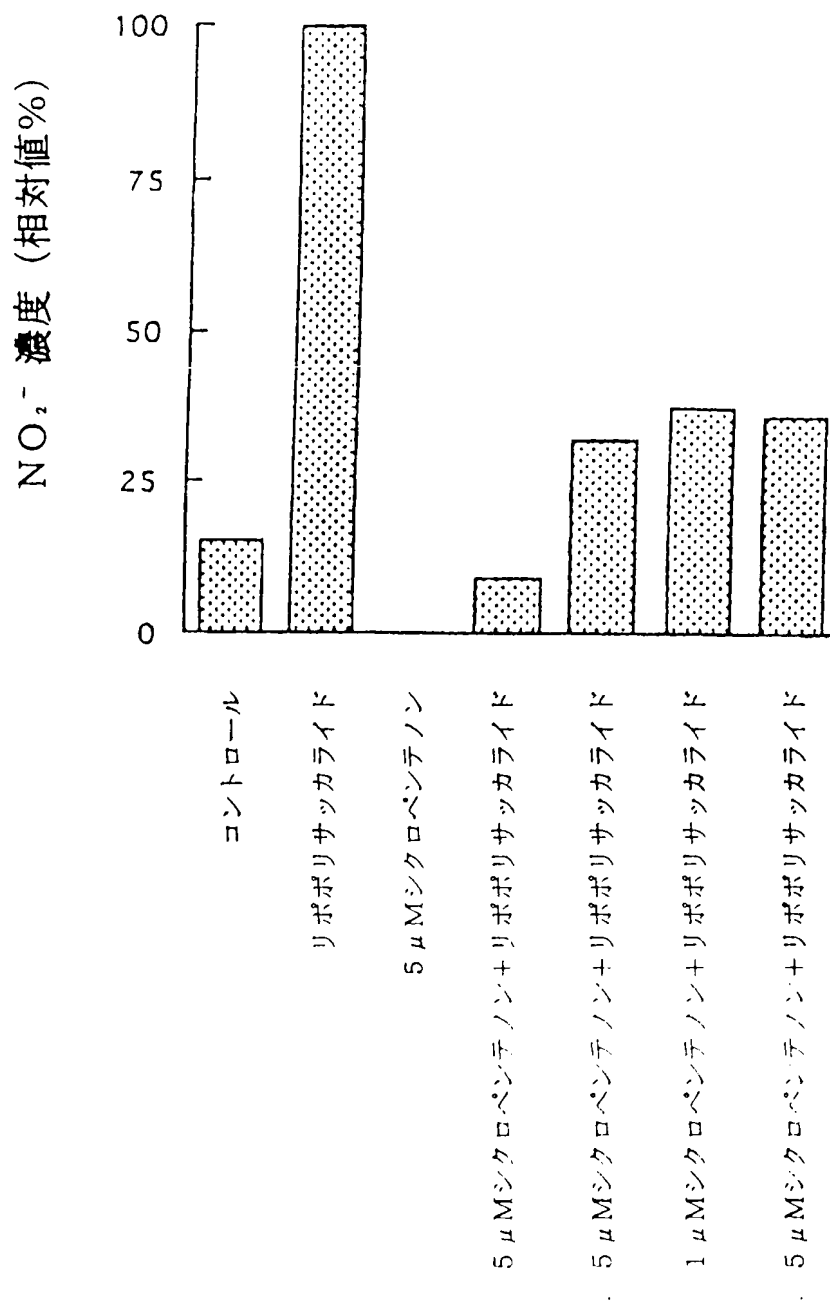


図 8



8 / 14

図 9

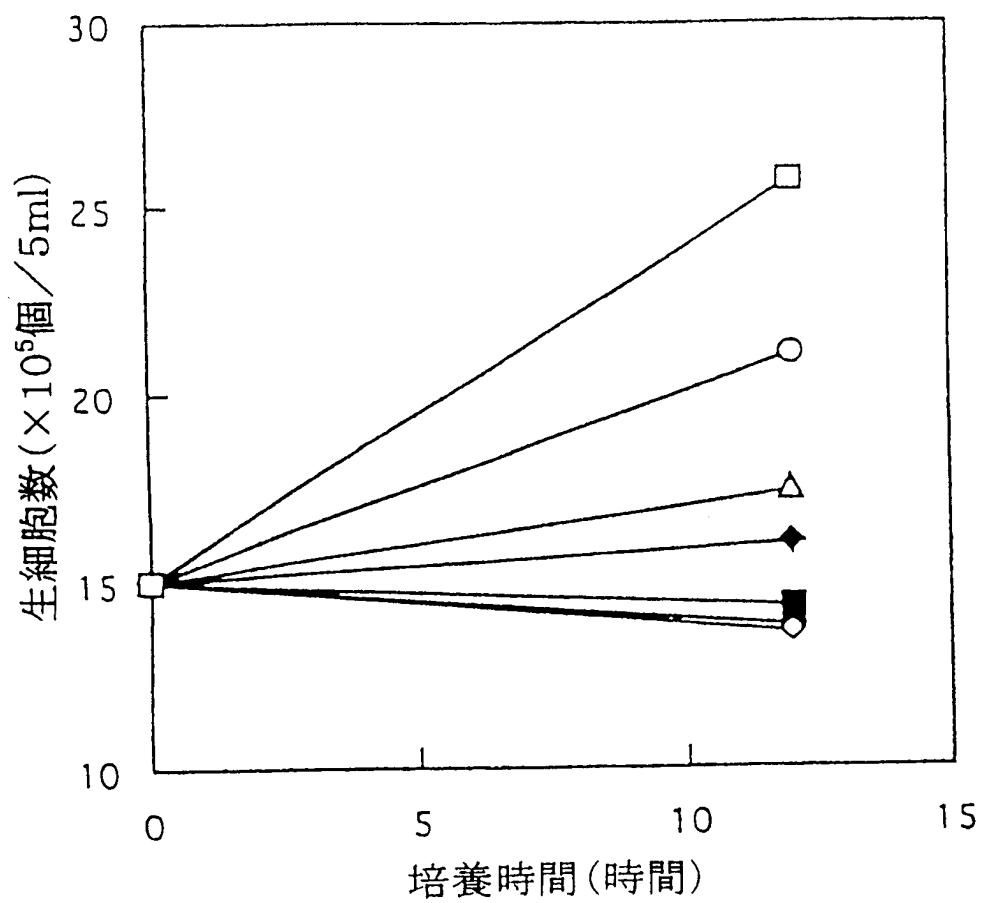




図 1 O

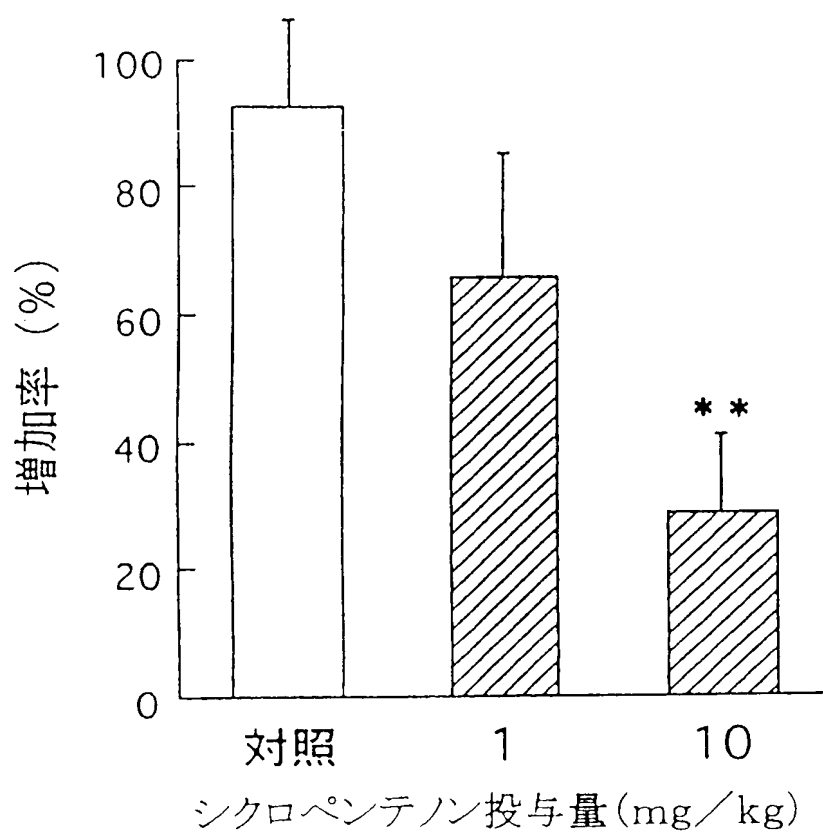


図 1 1

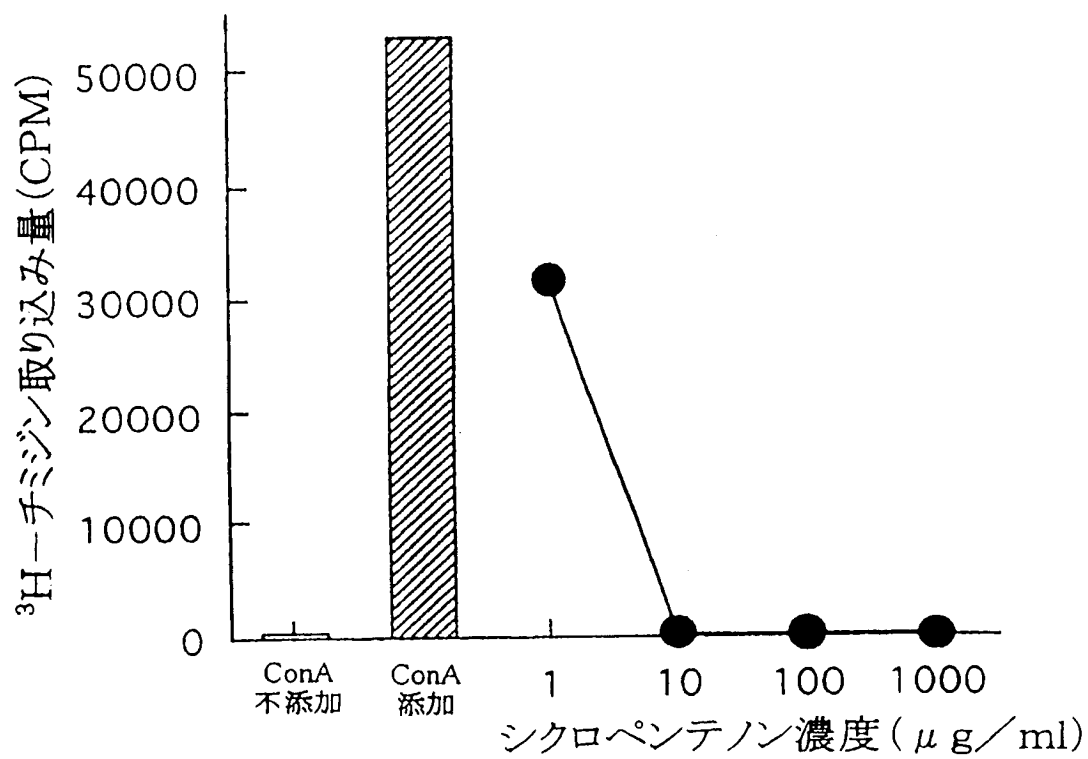


図 1 2

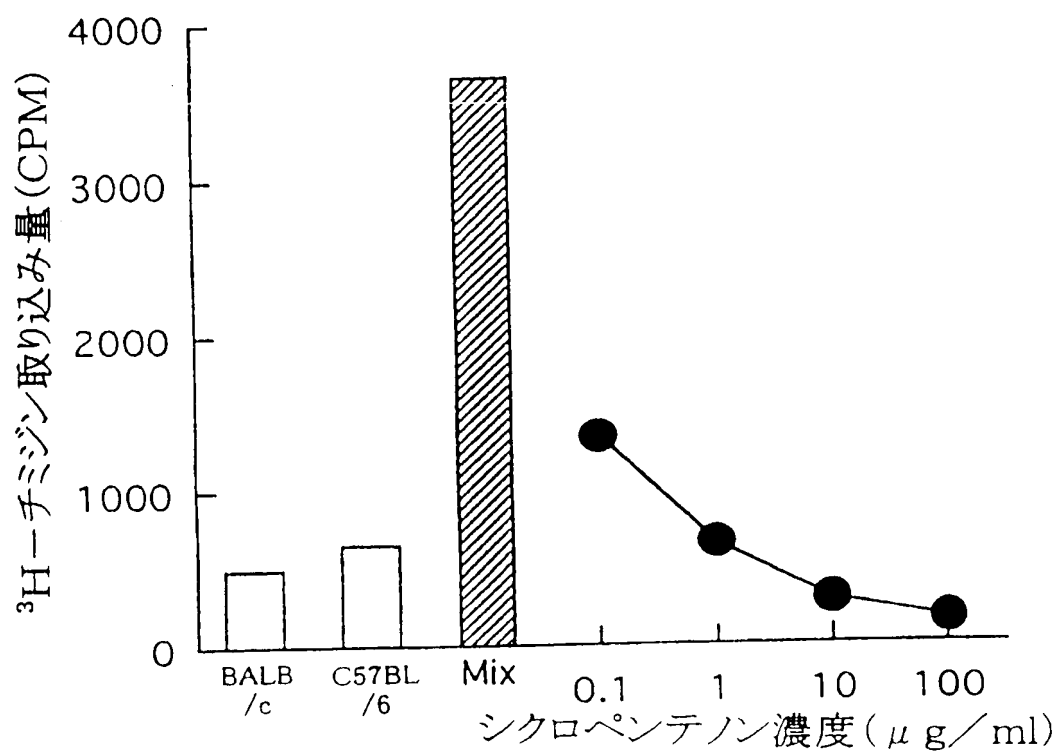


図 1 3

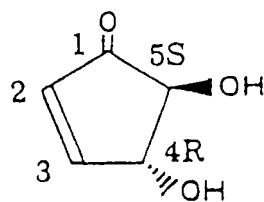
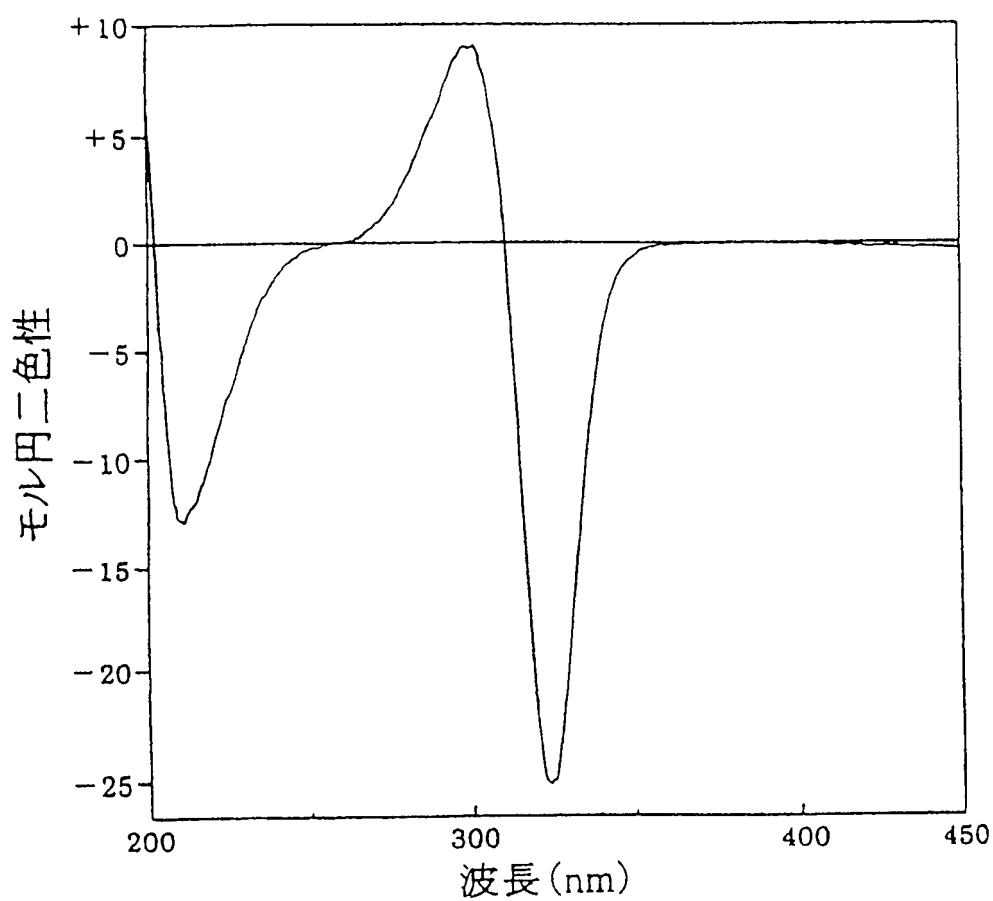
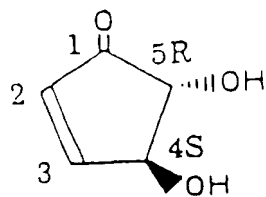
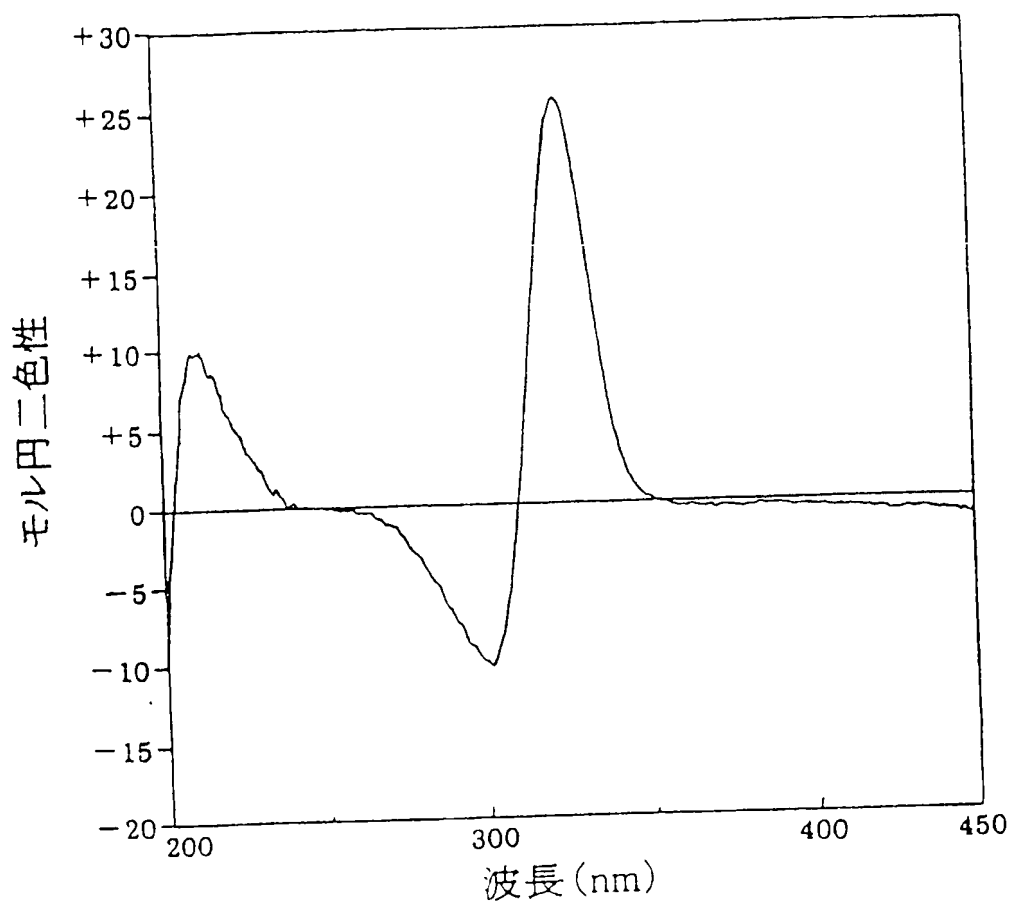


図 1 4



1 4 1 4

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/01149

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>6</sup> A61K31/12, A23L1/30, A23L2/52

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>6</sup> A61K31/12, A23L1/30, A23L2/52

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E, A	WO, 98/13328, A1 (Takara Shyuzo Co., Ltd.), April 2, 1998 (02. 04. 98) (Family: none)	1-2

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
"E" earlier document but published on or after the international filing date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
May 15, 1998 (15. 05. 98)Date of mailing of the international search report  
May 26, 1998 (26. 05. 98)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 98/01149

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>8</sup> A61K31/12, A23L1/30, A23L2/52

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>8</sup> A61K31/12, A23L1/30, A23L2/52

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
E, A	WO, 98/13328, A1 (Takara Shyuzo Co., Ltd.) 2. 4月. 1998 (02. 04. 98) (ファミリーなし)	1-2

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 出願による開示、使用、展示等に関する文献

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

国際調査機関の名称及び住所  
日本国特許庁 (J S A / I P)特許庁審査官 有限会社職員  
森田 啓信4 C 9485  
印

